



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas

Tesis Doctoral

AMARANTO COMO INGREDIENTE FUNCIONAL:
PROPIEDADES ANTIOXIDANTES
DE PROTEINAS Y PEPTIDOS



MARIA CECILIA ORSINI DELGADO

Año 2015

Este trabajo está dedicado a mis papás.

El presente trabajo, para obtener el grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos (CIDCA - CONICET CCT La Plata - UNLP), bajo la dirección de la Dra. Valeria A. Tironi y la co-dirección de la Dra. M. Cristina Añón.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de La Plata que me permitió formarme, por haberme permitido transitar todos estos años. Y a todos los profesores por haberme enseñado tanto desde lo académico como desde lo personal.

Al CONICET por las becas otorgadas, que han hecho posible la realización de este trabajo.

A mis directoras, Valeria y Cristina, por ser una gran guía durante todo el trabajo de investigación y el proceso de escritura, por sus importantes aportes, comentarios y sugerencias. Y por haber hecho posible la realización de este trabajo.

A Mónica y a Corina, del departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA.

A Marc, Elizabeth y Valérié, del INRA – Nantes.

A Agustina por su ayuda.

A todos mis compañeros del laboratorio y a los amigos que me llevo.

A todo el personal del CIDCA.

A mi mamá por ser la gran madre y persona que es. Por enseñarnos que ninguna piedra que se nos presente en el camino es imposible de esquivar. Por apoyarme incondicionalmente y darme todas las herramientas para ser quien soy hoy. Siempre te voy a admirar. Y a José por cuidarnos y traer alegría a la familia.

A mi papá que a pesar de no estar físicamente, sigue estando presente cada uno de los días de mi vida. Desde donde esté, sé que nos sigue cuidando y guiando.

A Lucía por entenderme más que nadie con una sólo mirada. Por hacer de mamá muchas veces, a pesar de ser la más pequeña. Por su palabra justa en el momento indicado. Y a Agus, por estar!

A Paula por ser como es e intentar entender que sea como soy. Y a Ramiro por ser el hermano varón que no tuve y la gran persona que es.

A Franco y a Martina por alegrarme cada momento desde su ingenuidad y ternura. Los adoro!

A mis abuelos, tío y primos.

A Carla por ser una hermana del corazón! Por haberme acompañado en este camino y haber estado siempre en cada momento importante de mi vida. Sos una persona y amiga increíble!

A Alicia, por ser mi segunda mamá. Por esas sonrisas cómplices, por haberme hecho sentir como en mi casa y en familia, a pesar de estar a miles de kilómetros de distancia. Estoy feliz de haberte conocido y de tenerte.

A todos mis amigos, por su amistad.

Y a todas aquellas personas que me acompañaron a lo largo de estos años.

A todos, sinceramente ¡¡muchas gracias!!

INTRODUCCION GENERAL

1. Alimentos funcionales.	18
2. Oxidación en sistemas biológicos.	24
3. Oxidación lipídica.	33
4. Péptidos bioactivos y antioxidantes de naturaleza proteica.	38
5. Amaranto.	41

OBJETIVOS	54
------------------	----

CAPITULO I

Introducción.	57
----------------------	----

Objetivos.	62
-------------------	----

Materiales y Métodos.

I. 1. Obtención de aislado e hidrolizado proteico de <i>Amaranthus mantegazzianus</i> .	63
I. 2. Simulación de la digestión gastrointestinal.	64
I. 3. Caracterización de las muestras.	64
3. a. Determinación de hidratos de carbono: Método de FCB.	64
3. b. Determinación de proteínas: Método de microKjeldahl.	65
3. c. Determinación de agua: Método indirecto.	65
3. d. Determinación de cenizas totales: Incineración en mufla.	65
3. e. Determinación de lípidos: Método de Soxhlet.	66
I. 4. Determinación del grado de hidrólisis.	67
I. 5. Obtención de fracciones solubles.	67
I. 6. Determinación de la concentración de proteínas solubles: Método de Lowry.	68
I. 7. Electroforesis SDS-PAGE en geles de Tricina.	68
I. 8. Cromatografía de exclusión molecular (FPLC).	71
I. 9. Cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC).	72
I. 10. Evaluación de la actividad antioxidante.	73
10. a. Secuestro del catión radical ABTS ⁺ .	73
10. b. Método ORAC.	75
I. 11. Análisis estadístico.	77

Resultados y Discusión.

I. 12. Composición del aislado proteico.	78
I. 13. Optimización de las condiciones de simulación de la digestión gastrointestinal.	78

I. 14. Evaluación de la actividad antioxidante.	82
14. a. Secuestro del catión radical ABTS ⁺ .	82
14. b. Método ORAC.	85
I. 15. Selección de las condiciones de digestión gastrointestinal simulada.	87
I. 16. Simulación de la digestión gastrointestinal sobre un hidrolizado con alcalasa.	88
16. a. Grado de hidrólisis.	89
16. b. Actividad antioxidante.	90
16. b. 1. Secuestro del catión radical ABTS ⁺ .	91
16. b. 2. Método ORAC.	91
I. 17. Caracterización molecular de las muestras.	92
17. a. Electroforesis SDS-PAGE en gel de tricina.	92
17. b. Caracterización de los hidrolizados mediante RP-HPLC preparativa.	94
17. c. Cromatografía de exclusión molecular (FPLC).	95
Conclusiones.	99
CAPITULO II	
Introducción.	102
Objetivos.	109
Materiales y métodos.	
II. 1. Muestras utilizadas.	110
II. 2. Método ORAC.	110
II. 3. Método HORAC.	111
II. 4. Secuestro del radical superóxido.	113
II. 5. Secuestro del radical óxido nítrico.	114
II. 6. Secuestro del anión peroxinitrito.	116
II. 7. Resonancia de spin – electrón.	117
II. 8. Análisis estadístico.	123
Resultados y discusión.	
II. 9. Secuestro de radicales derivados del AAPH.	124
II. 10. Efecto frente a radicales hidroxilo.	129
II. 11. Secuestro del radical superóxido.	132
II. 12. Secuestro del óxido nítrico.	134
II. 13. Secuestro del anión peroxinitrito.	136
Conclusiones.	138
CAPITULO III	
Introducción.	140

Objetivos.	151
Materiales y métodos.	
III. 1. Separación de fracciones por cromatografía de filtración en gel (FPLC).	152
III. 2. Ensayo ORAC sobre fracciones.	152
III. 3. Ensayo HORAC sobre fracciones.	153
III. 4. Simulación de la absorción intestinal.	153
4. a. Materiales y medios de cultivo utilizados.	153
4. b. Cultivo de células Caco2-TC7.	154
Descongelado de las células.	154
Tripsinado y recuento de las células.	154
Ensayos de citotoxicidad.	155
- Ensayo del ROJO NEUTRO.	155
- Ensayo del metil tetrazolium (MTT)	156
Monocapas de células Caco2-TC7.	157
Medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER)	158
Determinación de la actividad transportadora.	159
III. 5. Análisis por RP-HPLC analítica.	159
III. 6. Determinación de la concentración proteica.	160
Resultados y discusión.	
III. 7. Separación de fracciones por FPLC.	161
III. 8. Ensayos ORAC y HORAC sobre fracciones.	163
III. 9. Medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER).	167
III. 10. Ensayos de citotoxicidad.	168
III. 11. Simulación de la absorción intestinal.	170
III. 11. a. Cuantificación de proteínas.	170
III. 11. b. Comparación de los perfiles cromatográficos.	171
III. 11. c. Ensayo ORAC.	176
Conclusiones.	179
CAPITULO IV	
Introducción.	181
Objetivos.	184
Materiales y métodos.	
IV. 1. Muestras utilizadas.	185
IV. 2. Separación de fracciones por RP-HPLC preparativa.	185
IV. 3. Ensayo ORAC sobre fracciones.	185

IV. 4. Secuenciación de péptidos por espectrometría de masas.	186
IV. 5. Síntesis de péptidos antioxidantes.	189
IV. 6. Ensayo ORAC sobre péptidos sintetizados.	189
Resultados y discusión.	
IV. 7. Separación de fracciones por RP-HPLC preparativa.	190
IV. 8. Ensayo ORAC sobre fracciones.	191
IV. 9. Identificación de fracciones activas por espectrometría de masas.	193
IV. 10. Selección de péptidos activos: síntesis y ubicación en la globulina 11S.	197
IV. 11. Evaluación de la actividad antioxidante de péptidos sintetizados (ORAC).	202
Conclusiones.	206
CAPITULO V	
Introducción.	208
Objetivos.	227
Materiales y métodos.	
V. 1. Purificación del aceite.	228
V. 2. Preparación de las emulsiones aceite en agua.	229
V. 3. Distribución de tamaño de partículas.	229
V. 4. Microscopía óptica.	233
V. 5. Determinación del consumo de oxígeno.	233
V. 6. Determinación de productos primarios de oxidación: Dienos conjugados.	234
V. 7. Determinación de productos secundarios de oxidación: Ensayo del TBA.	234
V. 8. Determinación de proteínas solubles en la fase acuosa.	235
V. 9. Análisis estadístico.	236
Resultados y discusión.	
V. 10. Caracterización fisicoquímica de las emulsiones.	238
10. a. Determinación de proteínas solubles.	238
10. b. Análisis del tamaño de partícula.	241
V. 11. Evaluación de la oxidación lipídica.	248
11. a. Consumo de oxígeno.	248
11. b. Determinación de productos primarios de la oxidación.	250
11. c. Determinación de productos secundarios de la oxidación.	252
Conclusiones.	256
CONCLUSIONES GENERALES	258
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	261

INTRODUCCION GENERAL

1. Formación de especies reactivas del oxígeno a lo largo de la cadena respiratoria.	25
2. Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS).	26
3. Diagrama esquemático de la formación de ROS y RNS.	27
4. Reacción de Fenton/Haber-Weiss.	28
5. Mecanismo de acción de ciertas enzimas “antioxidantes” en los organismos aerobios.	30
6. Etapas de la oxidación lipídica.	34
7. Sistemas sobre los que podrían actuar los distintos péptidos bioactivos.	38
8. Distintas variedades de amaranto.	41
9. Semillas de amaranto.	42
10. Estructura del homohexámero de la globulina 11S.	47

CAPITULO I

I.1. Diagrama esquemático del equipo Soxhlet.	66
I.2. Modelo de separación por FPLC.	71
I.3. Espectros de absorción del catión radical ABTS ^{•+} .	74
I.4. Posibles vías de oxidación de la FL en presencias de APPH.	76
I.5. Curvas dosis-respuesta de la actividad secuestrante del ABTS ^{•+} de <i>Aisc</i> y <i>Apepa4</i> .	83
I.6. Curva de calibración del Trolox para el ensayo ORAC.	85
I.7. Curvas dosis-respuesta de las fracciones solubles para el ensayo ORAC.	86
I.8. Grado de hidrólisis en función de la progresión de la digestión gastrointestinal.	90
I.9. Actividad antioxidante de <i>Hal</i> c y <i>Hal</i> cDIG.	92
I.10. Gel de tricina en electroforesis SDS-PAGE.	93
I.11. Cromatogramas obtenidos por RP-HPLC preparativa.	95
I.12. Cromatogramas de exclusión molecular, columna Superdex 75.	96
I.13. Cromatogramas de exclusión molecular, columna Superdex 30.	98

CAPITULO II

II.1. Reducción del NBT causada por el radical superóxido.	114
II.2. Oxidación de la sonda DCFH (no fluorescente) a DCF (fluorescente).	116
II.3. Reacción entre una nitrona y un radical libre, formando un aducto de espín.	119
II.4. Estructura del PBN y del DMPO.	119
II.5. Esquema de funcionamiento de un equipo EPR.	121
II.6. Señal EPR del aducto formado entre el radical derivado del AAPH y el PBN.	122

II.7. Señal EPR del aducto formado entre el radical hidroxilo y el DMPO.	123
II.8. a) Curvas dosis-respuesta para el ensayo ORAC.	125
b) Curvas ORAC: Comportamiento dosis-respuesta sigmoideo.	125
II.9. a) Curvas dosis-respuesta: EPR evaluando radicales derivados del AAPH.	126
b) Curvas EPR de radicales del AAPH: Comportamiento dosis-respuesta sigmoideo.	126
II.10. a) Curvas dosis-respuesta correspondientes al ensayo HORAC.	130
b) Curvas HORAC: Comportamiento dosis-respuesta sigmoideo.	130
II.11. a) Curvas dosis-respuesta para el ensayo EPR-OH [•] .	131
b) Curvas EPR-OH [•] : Comportamiento dosis-respuesta sigmoideo.	131
II.12. a) Curvas dosis-respuesta para el ensayo del secuestro de radicales superóxido.	134
b) Curvas de secuestro del O ₂ ^{•-} : Comportamiento dosis-respuesta sigmoideo.	134
II.13. a) Curvas dosis-respuesta para el ensayo de secuestro del óxido nítrico.	136
b) Curvas de secuestro del NO [•] : Comportamiento dosis-respuesta sigmoideo.	136
II.14. a) Curvas dosis-respuesta para el ensayo de secuestro de peroxinitritos.	137
b) Curvas de secuestro del ONOO [•] : Comportamiento dosis-respuesta sigmoideo.	137

CAPITULO III

III.1. Conformación de la superficie absortiva del intestino.	141
III.2. Mecanismos de transporte a través de la pared intestinal.	142
III.3. Hidrólisis de oligopéptidos y absorción a través de transportadores.	144
III.4. Inserto de poliéster.	157
III.5. Esquema gráfico de un inserto.	158
III.6. Voltímetro Millicel.	158
III.7. Cromatogramas FPLC de AisDIG.	162
III.8. Cromatogramas FPLC de HalcDIG.	162
III.9. a) Trolox eq (μM) de las muestras provenientes de AisDIG.	164
b) Ácido clorogénico eq (mg/ml) de las muestras provenientes de AisDIG.	164
III.10. a) Trolox eq (μM) de las muestras provenientes de HalcDIG.	165
b) Ácido clorogénico eq (mg/ml) de las muestras provenientes de HalcDIG.	165
III.11. Trolox eq y ácido clorogénico eq de las fracciones de las muestras 6-14 de AisDIG.	166
III.12. Trolox eq y ácido clorogénico eq de las fracciones de las muestras 6-14 de HalcDIG.	167
III.13. Variación de la resistencia eléctrica transepitelial en la incubación de las células.	168
III.14. Resultados de los ensayos de citotoxicidad: MTT y Rojo Neutro.	169
III.15. Cromatogramas RP-HPLC del ensayo de absorción de AD50.	172
III.16. Cromatogramas RP-HPLC del ensayo de absorción de AD52.	173
III.17. Cromatogramas RP-HPLC del ensayo de absorción de HD52.	174

III.18. Cromatogramas RP-HPLC del ensayo de absorción de HD57.	175
CAPITULO IV	
IV.1. Diagrama esquemático de un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos.	187
IV.2. Cromatogramas obtenidos por RP-HPLC de Ais y AisDIG.	190
IV.3. Cromatogramas indicando fracciones seleccionadas para analizar por LC/MS-MS.	194
IV.4. Secuencia de la globulina 11S y posición de cada uno de los péptidos sintetizados.	202
IV.5. Resultados del ensayo ORAC para cada uno de los péptidos sintetizados.	203
CAPITULO V	
V.1. Esquema de los distintos homogeneizadores utilizados para producir emulsiones.	210
V.2. Principales parámetros involucrados en la oxidación lipídica de emulsiones o/w.	219
V.3. Incubación de las emulsiones en estufa a 37 °C con agitación rotacional.	238
V.4. Estructura molecular del Tween 20.	240
V.5. Distribución volumétrica de tamaño de partículas de los sistemas control a t = 0.	242
V.6. Microfotografía del sistema control a pH 8 a t = 0.	242
V.7. Distribución volumétrica de tamaño de partículas de los sistemas a pH 2 a t = 0.	243
V.8. Microfotografía del sistema Ais pH 2 a t = 0.	243
V.9. Distribución volumétrica de tamaño de partículas en el tiempo a pH 2.	244
V.10. Microfotografía del sistema Ais pH 2 a las 72 horas.	245
V.11. Distribución volumétrica de tamaño de partículas en el tiempo a pH 8.	247
V.12. Consumo de oxígeno en función del tiempo.	248
V.13. Formación de dienos conjugados.	251
V.14. Complejo MDA-TBA.	253

INTRODUCCION GENERAL

1. Principales efectos beneficiosos producidos por los péptidos.	39
--	----

CAPITULO I

I.1. Efecto de las condiciones de hidrólisis sobre el GH y la solubilidad proteica.	80
I.2. Solubilidad y concentración proteica de los digeridos.	81
I.3. Actividad antioxidante de las muestras: IC ₅₀ para el ensayo del ABTS y Valor ORAC.	84

CAPITULO II

II.1. Principales especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS).	102
II.2. Vida media de algunos radicales.	103
II.3. IC ₅₀ en cada uno de los ensayos de evaluación de la actividad antioxidante.	128

CAPITULO III

III.1. Patrones de peso molecular FPLC.	161
III.2. Constitución de las 17 muestras obtenidas a partir de las fracciones de FPLC.	163
III.3. Masas moleculares de las fracciones utilizadas para ensayos de absorción intestinal.	169
III.4. Proteínas (μg) en las distintas fracciones, luego de los ensayos de absorción.	170
III.5. Valor ORAC de las muestras provenientes de los ensayos de absorción.	177

CAPITULO IV

IV.1. Resultados del ensayo ORAC sobre las fracciones obtenidas por RP-HPLC.	192
IV.2. Péptidos encontrados en cada una de las fracciones analizadas de AisDIG.	196
IV.3. Familias de péptidos en AisDIG, derivados de la globulina 11S de amaranto.	197
IV.4. Características de los péptidos sintetizados.	201
IV.5. Actividad antioxidante (ORAC) de péptidos sintéticos.	204

CAPITULO V

V.1. Concentración proteica de los solubles a distintos pHs.	239
V.2. Concentración de proteínas en la fase acuosa de las emulsiones.	240
V.3. Variación del d(4,3) (μm) durante la incubación de las emulsiones a pH 2.	243
V.4. Variación del d(4,3) (μm) durante la incubación de las emulsiones a pH 8.	246
V.5. Parámetros obtenidos de la cinética de consumo de oxígeno.	249
V.6. Parámetros obtenidos de la cinética de formación de dienos conjugados.	252

TABLA DE ABREVIATURAS

AAPH	Ácido 2,2'-azobis-[2-metilpropionamida]-dihidrocloruro.
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin -6-sulfónico).
AIE	Área interfacial específica.
AUC	Área bajo la curva.
BHA	Butil-hidroxianisol.
BHT	Butil-hidroxitolueno.
CAA	Código Alimentario Argentino.
CAT	Catalasa.
CTE	Cadena transportadora de electrones.
CONAL	Comisión Nacional de Alimentos.
COPAL	Coordinadora de las Industrias de Productos Alimenticios.
DCFH-DA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato.
DCFH	2',7'-diclorofluorescina.
DCF	2',7'-diclorofluoresceína.
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco.
DMPO	5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DTPA	Ácido dietiltri amino pentaacético.
d(3,2)	Diámetro promedio de Sauter.
d(4,3)	Diámetro promedio de De Brouker.
EPR	Resonancia paramagnética electrónica.
ESR	Espectroscopía de resonancia de espín electrónica.
FCB	Fehling Causse Bonnans.
FDA	Food and Drug Administration.

GH	Grado de hidrólisis.
GPx	Glutación peroxidasa.
GSH	Glutación reducido.
HAT	Transferencia de un átomo de hidrógeno (Hydrogen Atom Transfer).
HMWE	Emulsificantes de alto peso molecular.
HORAC	Capacidad de inhibir la formación de radicales hidroxilo.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno.
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50 %.
L	Fase lag.
LMWE	Emulsificantes de bajo peso molecular.
MDA	Malonaldehído.
MLP	Largo promedio de las cadenas peptídicas.
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio.
μ	Velocidad de reacción.
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido.
NBT	Nitroazul de tetrazolio.
NOS	Óxido nítrico sintasa.
NO·	Radical óxido nítrico.
NPS	Nitroprusiato de sodio.
O ₂ ^{·-}	Anión superóxido.
O ₃	Ozono.
OH·	Radical hidroxilo.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ONOO·	Peroxinitrito.
ORAC	Capacidad de secuestro de radicales peroxilo.
PAGE	Poliacrilamide Gel Electrophoresis.
PBN	α-fenil-N-tert-butilnitrona.

PBS	Buffer fosfato salino.
PMS	Metasulfato de fenazina.
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados.
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship.
R [•]	Radical alquilo.
RNS	Especies Reactivas del Nitrógeno.
RO [•]	Radical alcoxilo.
ROO [•]	Radical peroxilo.
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
SET	Transferencia de un electrón (Simple Electron Transfer)
SOD	Superóxido dismutasa.
SOR	Secuestro del radical superóxido.
t _{1/2}	Tiempo medio de reacción.
TBA	Ácido tiobarbitúrico.
TBHQ	Terbutilhidroquinona.
TE	Trolox equivalente.
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilen-diamina.
TFA	Ácido trifluoroacético.
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico.

*INTRODUCCION y
OBJETIVOS GENERALES*

1.- Alimentos funcionales.

Hace ya tiempo que los países industrializados deben encarar innovaciones y desafíos vinculados con la alimentación y la salud de la población, tal como lo reconoce la Organización Mundial de la Salud (OMS) en sus reportes técnicos "Dieta, Nutrición y Prevención de Enfermedades Crónicas" (2003) y "Estrategia Mundial sobre Régimen Alimentario, Actividad Física y Salud" (2004). Existe una estrecha relación entre la alimentación y ciertas enfermedades crónicas no transmisibles, reconociéndose los efectos de la dieta sobre el desarrollo cognitivo y psicomotor, la inmunidad, el crecimiento y la composición corporal, entre otros. Además, el enorme incremento del costo de la atención de la salud dado por la mayor esperanza de vida, el aumento del conocimiento científico, los avances logrados en tecnología alimentaria y en las investigaciones sobre nutrición, y los grandes cambios en el estilo de vida, han llevado a que cada vez resulte de mayor interés para los consumidores permanecer informados acerca de lo que consumen. Y por ello, también, son cada vez más las personas que se preocupan por su autocuidado y que buscan en el mercado productos que contribuyan a su salud y bienestar, en especial aquellos que ejercen una acción beneficiosa sobre algunos procesos fisiológicos y/o reducen el riesgo de padecer ciertas enfermedades. Estas tendencias estimulan a la industria a desarrollar constantemente nuevos productos fortificados, enriquecidos, o con agregados de ciertas sustancias, así como alimentos libres de algún componente considerado nocivo (alérgenos, grasa, etc.) (ILSI Europe, 2002).

En la actualidad, aún no existe una definición única consensuada de *alimento funcional*, siendo algunas de las definiciones más difundidas entre la población las siguientes:

- *"Aquel alimento que, además de sus valores nutritivos intrínsecos, demuestra ejercer efectos beneficiosos sobre una o más funciones selectivas del organismo, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas."*
- *"Un alimento funcional es aquel en el que alguno/s de sus componentes afectan ciertas funciones del organismo de manera específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico más allá de su valor nutritivo tradicional; dicho efecto puede ser*

contribuir a la mantención de la salud y el bienestar, a la disminución del riesgo de contraer enfermedades o a ambas”.

- *“Alimentos que tienen potencialmente un efecto beneficioso en la salud, cuando se consumen como parte de una dieta variada, en forma regular y a niveles efectivos, incluidos los alimentos fortificados, enriquecidos o mejorados.”*
- *“Alimentos capaces de aportar sustancias con funciones fisiológicas definidas, brindando beneficios para la salud de quien los consume”.*

Los alimentos funcionales, por lo tanto, no constituyen una entidad única, bien definida y correctamente caracterizada. De hecho, una amplia variedad de productos alimenticios se incluyen (o se incluirán en el futuro) en la categoría de alimentos funcionales. Éstos abarcan diversos componentes, nutrientes y no nutrientes, que afectan a toda una gama de funciones corporales relacionadas con el estado de bienestar y salud, la reducción del riesgo de enfermedad, o ambas. No se trata de comprimidos ni cápsulas, sino de productos que forman parte de una dieta normal. Además, cabe aclarar que los alimentos funcionales no curan ni previenen por sí solos alteraciones ni enfermedades, no son indispensables y sus efectos benéficos deben estar científicamente fundamentados.

Normativa.

Ante la importancia que han adquirido estos alimentos, en algunos países se ha avanzado en la regulación normativa. No obstante, muchos otros –entre los cuales se encuentra Argentina- aun no arribaron a un consenso al respecto, puesto que resulta muy complejo incluir en una sola categoría, una amplia variedad de productos cuyos ingredientes y efectos en el organismo son muy diversos. A esto se agrega la necesidad de tener una sólida fundamentación acerca de sus propiedades, ya que en muchos casos sus efectos pueden ser influidos por la interacción con sustancias provenientes de otros alimentos y/o del propio organismo. En este contexto, cobra relevancia la confusión existente hoy entre los consumidores, e incluso entre los mismos profesionales de la salud, sobre los alimentos funcionales y los beneficios que cada uno de ellos aporta a la salud. Pese a estas limitantes, muchos países han avanzado en la reglamentación de las llamadas “propiedades saludables” (también conocidas como claims saludables o alegaciones de salud), definidas como cualquier declaración o presentación que describa, afirme o sugiera que existe una relación entre una categoría de alimento o uno de sus constituyentes y la salud.

Panorama internacional.

Normativa Codex.

En la norma “Directrices para el uso de declaraciones nutricionales y saludables” -CAC/GL 23-1997- (enmendada en 2011), el Codex Alimentarius establece el ámbito de aplicación de algunas definiciones relativas al tema. Además, contiene un anexo que especifica recomendaciones sobre la base científica de las declaraciones de propiedades saludables.

Japón.

A comienzos del decenio de 1980 se iniciaron tres programas de investigación a gran escala financiados por el gobierno del Japón sobre “análisis sistemático y desarrollo de los alimentos funcionales”, “análisis de la regulación fisiológica de la función de los alimentos” y “análisis de los alimentos funcionales y diseño molecular”. En un esfuerzo nacional por reducir el costo creciente de la atención de salud, se estableció en 1991 una categoría de alimentos potencialmente beneficiosos, denominados “alimentos de uso específico para la salud” (Foods for Specific Health Use, FOSHU). Se denominan FOSHU a aquellos alimentos de los que se espera que ejerzan un efecto beneficioso específico sobre la salud, por adición de determinados constituyentes activos o por un efecto derivado de la supresión en los mismos de alergenitos alimentarios. Los efectos de tales adiciones o supresiones deben haber sido evaluados científicamente, y deberá solicitarse autorización para formular alegaciones relativas a los beneficios específicos que cabe esperar de su consumo. Para ser considerados FOSHU, se requieren pruebas de que el producto alimenticio final, y no sus componentes individuales aislados, ejerza un efecto saludable sobre el organismo cuando se lo consume como parte de una dieta corriente. Los productos FOSHU deben presentarse en forma de alimentos habituales y no como comprimidos o cápsulas. Se utiliza el sello FOSHU para distinguir a aquellos alimentos de los que se espera un efecto beneficioso específico sobre la salud (ILSI Europe, 2002).

Unión Europea.

La UE ha creado una Comisión de Acción Concertada sobre Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa (Functional Food Science in Europe, FUFOSE). El programa ha sido coordinado por el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (International Life Sciences Institute, ILSI Europe), y su objetivo es desarrollar y establecer un enfoque científico sobre las pruebas que se necesitan para respaldar el desarrollo de productos alimenticios que

puedan tener un efecto beneficioso sobre una función fisiológica del cuerpo, mejorar el estado de salud y bienestar de un individuo, y/o reducir el riesgo de desarrollar enfermedades. En este sentido, la Comisión elaboró en 1999 un documento de consenso: “Conceptos científicos sobre los alimentos funcionales en Europa” (Ashwell, 2001; Bellisle y col., 1998; Diplock y col., 1999; Robertfroid, 2000). Asimismo, en diciembre de 2006, la UE aprobó el Reglamento (CE) N°1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, que establece las definiciones, criterios específicos y condiciones de uso de estas declaraciones. Luego, a través de reglamentos específicos se publican los listados de declaraciones de propiedades saludables denegadas y/o autorizadas, especificando el nutriente, sustancia, alimento o categoría de alimento, el tipo de declaración, las condiciones y/o restricciones de uso del alimento, o bien una declaración o advertencia complementaria. Los países han actuado como depositarios de las declaraciones de interés para la industria, registrándose sólo en Francia 4000 solicitudes. A la fecha, son numerosos y extensos los documentos que establecen los fundamentos de la política comunitaria para continuar trabajando en el tema.

Brasil.

En los últimos años, Brasil también avanzó en la legislación de estos productos. A través de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) el Ministerio de Salud ha generado las resoluciones ANVISA/MS 16/99, ANVISA/MS 17/99, ANVISA/MS 18/99 y ANVISA/MS 19/99. Tratan sobre procedimientos para registros de alimentos y/o nuevos ingredientes y para alimentos con alegación de propiedades funcionales y/o salud en su rotulado. También establecen directrices básicas para la evaluación de riesgo y seguridad de alimentos, y para el análisis y comprobación de propiedades funcionales alegadas en el rótulo de los alimentos.

Estados Unidos.

En este país los alimentos funcionales no están legalmente definidos, y no se evidencia el propósito de legislar sobre ellos en particular. Hasta la fecha, las Leyes de etiquetado y Educación Nutricional, y la de Suplementos Dietarios, Salud y Educación, constituyen el engranaje que mueve los límites dentro de los cuales se encuadra el tema, sobre la base de un tratamiento caso a caso. Asimismo, la FDA (Food and Drug Administration) regula los productos alimenticios en función de su uso y la información sobre salud que se pretende

declarar en el envase, por lo que en las etiquetas de los alimentos y de los suplementos dietéticos se permite incluir dos tipos de declaraciones: información sobre estructura y función, que describe los efectos en el funcionamiento normal del cuerpo; e información sobre reducción de los riesgos de enfermedades (salud) que implican una relación, entre los componentes de la dieta y una enfermedad o trastorno de la salud, siempre y cuando haya sido aprobada por la FDA y esté respaldada por un importante acuerdo científico (ILSI North America Technical Committee on Food Components for Food Promotion, 1999).

En cuanto a las reivindicaciones funcionales de un alimento, ellas son objeto de una variedad de regulaciones, dependiendo de si el producto se ubica en la categoría de alimento, suplemento dietario, alimento médico o droga.

Situación en Argentina.

En nuestro país la definición de los alimentos funcionales es analizada por un grupo de trabajo de la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) desde el año 2009, además otro grupo ha avanzado elaborando protocolos que establecen los requisitos y evaluaciones para la inclusión de probióticos y/o prebióticos en un alimento. Dichos proyectos, fueron incorporados al Código Alimentario Argentino (CAA) a fines del año 2011, a través de las siguientes normas: Resolución Conjunta 229/2011 SPReI y 731/2011 SAGyP y Resolución Conjunta 261/2011 SPReI y 22/2011 SAGyP. Asimismo, y en estrecha relación con lo antes mencionado, la CONAL se encuentra estudiando una propuesta de incorporación del Art. 236 al Capítulo V: Rotulación del CAA, referido a las declaraciones de propiedades saludables, que fue presentada por la Coordinadora de las Industrias de Productos Alimenticios (COPAL), en marzo de 2009. En ese marco, se considera como “declaración de propiedad saludable” a cualquier representación que exprese, sugiera o implique la existencia de una relación entre el alimento -o un constituyente de dicho alimento- y la salud. Divide a las mismas en tres tipos: declaración de propiedades de función de nutrientes; declaración de otras propiedades de función o declaración de propiedades de incremento de función; y declaraciones de propiedades de reducción de riesgo de enfermedad.

En relación a ello, cabe aclarar que actualmente el CAA prohíbe en forma expresa las indicaciones -en los rótulos o anuncios, propaganda radial, televisiva, oral o escrita- que se refieran a propiedades medicinales, terapéuticas o aconsejar su consumo por razones de estímulo, bienestar o salud. (Artículo 235 del CAA, incorporado por Res. Conj. SPReRS

149/05 y SAGPyA 683/05). Debido a las implicancias que tiene implementar la norma, a la información adicional requerida, la amplitud de criterios y otros factores, enmarcar estas alegaciones en una normativa es un desafío tan importante como delicado, por lo que el tema continúa en estudio en el seno de la CONAL.

Por otro lado, mediante una disposición del Ministerio de Salud de la Nación de fines del 2011 (Disposición 7730, Noviembre de 2011) ha sido implementada en nuestro país una *"Guía para la Presentación y Evaluación Científica de Declaraciones de Propiedades Saludables en Alimentos"*, creándose además una Comisión Evaluadora para la autorización de Declaraciones de Propiedades Saludables en Alimentos.

http://www.anmat.gov.ar/webanmat/normativa/Disposicion_7730-2011.pdf

Es interesante remarcar que para poder incorporar una declaración de propiedades saludables a un producto, este documento establece que se analizarán “los estudios científicos, en humanos y otros estudios (*in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*) que avalen la declaración, incluyendo evidencia favorable y desfavorable actualizada respecto de la misma”, lo cual reafirma la necesidad de realizar estos estudios cuando se evalúa un ingrediente o alimento funcional.

En definitiva, debe tenerse presente que los alimentos funcionales son un aspecto de la dieta, la que a su vez constituye sólo un factor dentro de un estilo de vida que conduce a la buena salud. Sin duda, hábitos tales como actividad física regular, prescindir del consumo de tabaco, mantener un adecuado peso corporal y reducir el estrés, influyen positivamente sobre la salud. En tal sentido, los alimentos funcionales pueden resultar un complemento interesante, dentro de una estrategia que promueva una buena salud, pero no cumplen por sí solos el objetivo de preservarla.

Es un hecho el auge que protagonizan los alimentos funcionales en el mercado, factor que además ha generado un gran incentivo para la industria de los alimentos. De allí deriva la importancia de contar con un marco regulatorio adecuado que permita garantizar la protección de los consumidores, brindar la información necesaria para que el comprador pueda elegir con pleno conocimiento, crear condiciones iguales de competencia para la industria alimentaria, y estimular el desarrollo de una adecuada innovación en alimentos incorporando ingredientes con propiedades funcionales. Por lo tanto, los argumentos empleados para fundamentar el beneficio para la salud que arroja un alimento deben ser

veraces, sin ambigüedades y comprensibles para el común de la población, teniendo en cuenta que el alimento debe ser consumido en el contexto global de los hábitos de alimentación, sin fomentar el consumo excesivo de un producto determinado en detrimento de otros.

2.- Oxidación en sistemas biológicos.

Un radical libre se puede definir como un átomo o molécula que contiene uno o más electrones desapareados, capaz de tener una existencia independiente. Los radicales libres son generalmente más reactivos que los no-radicales debido a su electrón desapareado, pero diferentes radicales varían ampliamente en su reactividad.

La oxidación es un proceso que tiene lugar tanto en los organismos vegetales como animales y se encuentra provocada, entre otras cosas, por la presencia de radicales libres. Por definición, la molécula de oxígeno (O_2) califica como un radical libre debido a que contiene dos electrones desapareados, pero no es particularmente reactiva debido a que posee una distribución electrónica especial (Halliwell y Gutteridge, 1990). En los organismos aerobios, el oxígeno es habitualmente utilizado en los procesos de respiración celular, se reduce en las mitocondrias por captación de cuatro electrones y forma la molécula de agua (H_2O). Sin embargo, existen ciertas reacciones biológicas de oxidación en las cuales se transfiere un número menor de electrones al oxígeno, lo cual provoca una reducción parcial de esta molécula, generando productos altamente reactivos, conocidos como *ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO* (ROS = Reactive Oxygen Species). Dentro de las ROS o moléculas pro-oxidantes derivadas del oxígeno, se encuentra un grupo de sustancias radicalarias tales como los radicales peroxilo ($ROO\bullet$), el radical hidroxilo ($OH\bullet$), el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical óxido nítrico ($NO\bullet$) y el oxígeno singulete (1O_2); y un grupo de sustancias no radicalarias, aunque altamente reactivas, entre las que pueden mencionarse el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso ($HClO$) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Kohen y Nyska, 2002). También se utiliza el término *ESPECIES REACTIVAS DEL NITRÓGENO* (RNS = Reactive Nitrogen Species) para las especies derivadas del $NO\bullet$.

Las ROS pueden tener un origen tanto endógeno como exógeno. Entre las fuentes endógenas se destacan:

1.- La *cadena respiratoria*, donde la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de estos compuestos (*Figura 1*).

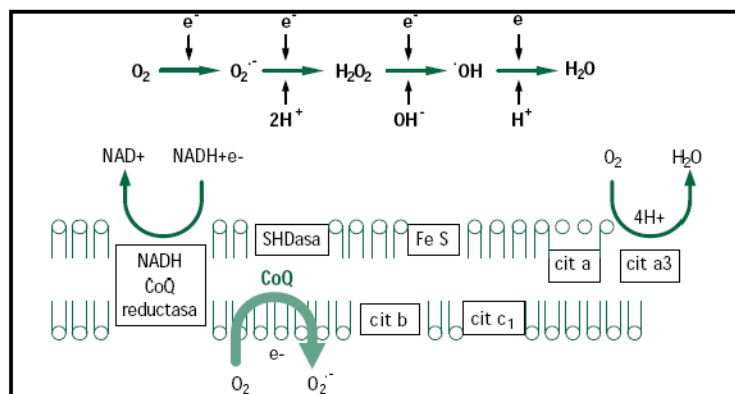


Figura 1.- Formación de especies reactivas de oxígeno a lo largo de la cadena respiratoria.

El radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) es de gran importancia, dado que otras especies reactivas se forman a partir de ciertas secuencias de reacción iniciadas por el $O_2^{\bullet-}$. Se genera por la reducción enzimática de transferencia de un solo electrón al O_2 , por acción de la xantina oxidasa, NADPH oxidasa o debido a la disfunción de la cadena transportadora de electrones. También se pueden formar otras ROS tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), como consecuencia de una transferencia incompleta de electrones en la cadena transportadora de electrones (CTE). Aproximadamente un 95 % del oxígeno que respiramos es reducido a H_2O por la acción de la citocromo oxidasa-a₃, último eslabón de la cadena de transporte electrónico. Además, a nivel del complejo quinona semiquinona-ubiquinol, el (Q_{10}) actúa como aceptor de electrones dando origen a la formación de radicales O_2 .

2.- Las *células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos)*, utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente el ion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). El cual puede convertirse en H_2O_2 y O_2 , debido a la reacción de dismutación catalizada por la superóxido dismutasa (SOD). Por otra parte, como mecanismo de defensa, dichas células también generan óxido nítrico (NO^{\bullet}), por acción de la óxido nítrico sintasa sobre la arginina intracelular. La combinación del $O_2^{\bullet-}$ con el NO^{\bullet} da lugar a la formación del peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual se puede descomponer en el ion nitrato o en dióxido de nitrógeno (NO_3^- o NO_2) y también es capaz de inducir la peroxidación lipídica de las lipoproteínas. Por otra parte, el H_2O_2 en presencia de metales de transición se convierte en el radical hidroxilo, capaz de inducir la oxidación lipídica (LP). Este conjunto de reacciones se muestran en la *Figura 2*.

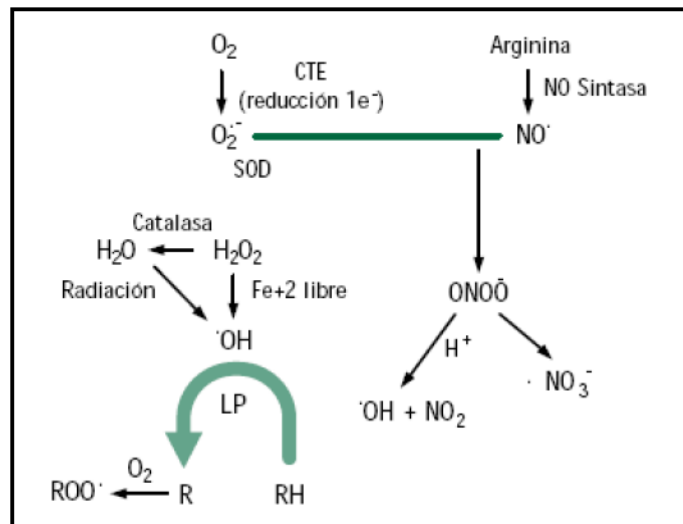


Figura 2.- Generación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en las células fagocitarias.

3.- La *autooxidación de compuestos de carbono reducido* como aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos dan lugar también a la formación de ciertos radicales.

4.- La *activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario* como la hipoxantina y xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa, son fuentes representativas de producción de ROS (Fridovich, 1976).

Las fuentes exógenas de radicales libres pueden ser:

1.- *Ambientales*: el humo del tabaco posee una mezcla de sustancias entre las que se encuentran el óxido nítrico y de azufre. Los óxidos de nitrógeno también pueden proceder de la contaminación atmosférica, así como ciertos hidrocarburos. El ozono (O_3), una ROS con un extraordinario poder oxidante, puede proceder de la acción de las radiaciones electromagnéticas sobre el oxígeno, de los campos eléctricos o de la combustión de carburantes, y es capaz de oxidar ciertos grupos ($-SH$, $-NH_2$, $-OH$, $-COH$) y de inducir la peroxidación lipídica en los fosfolípidos de las membranas celulares (Paredes Salido y col., 2002) entre otros.

2.- *Farmacológicas*: xenobióticos, drogas.

3.- *Nutricionales*: contaminantes, aditivos, oxidación de lípidos, entre otros.

reacciona con metales de transición dando lugar a la generación del radical hidroxilo (OH^\bullet), (Haber y Weiss, 1934 y previamente, Fenton, 1894), según el esquema de la *Figura 4*:

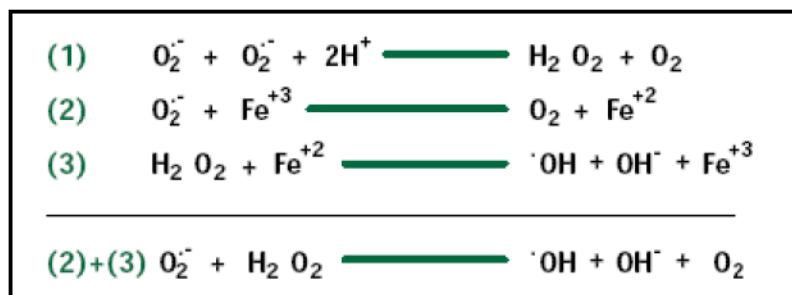


Figura 4.- Reacción de Fenton / Haber-Weiss

Las ROS producen diversas acciones sobre el organismo, siempre de importancia biológica y que pueden ser el origen del daño celular. Entre las principales pueden mencionarse (Kohen y Nyska, 2002):

- *Daño al ADN.* Pueden causar entrecruzamiento de proteínas-ADN, intercambio de cromátidas hermanas, daño a la estructura de la desoxirribosa-fosfato, oxidación de las bases nitrogenadas, conversión de bases, aperturas de anillos, liberación de bases, rompimiento de cadenas (una o dos hebras). El radical más activo es el OH^\bullet , el cual puede atacar tanto las purinas como las pirimidinas generando diversos productos de oxidación, siendo uno de los más importantes la 8-hidroxiguanina. Estas modificaciones inducen mutaciones y carcinogénesis, ya sea por la pérdida de expresión o por la síntesis de una proteína alterada.

- *Daño a proteínas.* Los especies OH^\bullet , RO^\bullet y ONOO^- son los que causan mayor daño, aunque las proteínas conteniendo grupos SH pueden sufrir oxidación por medio de H_2O_2 . Dentro de las modificaciones ocasionadas por los ROS pueden mencionarse peroxidación, daño a residuos aminoacídicos específicos, cambios en la estructura terciaria, degradación y fragmentación. Los productos de oxidación de las proteínas más usuales son aldehídos, cetocompuestos y carbonilos, siendo uno de los principales marcadores de este daño la 3-nitrotirosina. Como consecuencia de estas modificaciones puede ocurrir pérdida de actividad enzimática, funciones metabólicas alteradas, problemas para el establecimiento de potenciales de membrana y cambios en los tipos y niveles de proteínas celulares.

- *Daño a lípidos.* La oxidación de los lípidos de membrana provoca pérdida de la permeabilidad selectiva, la fluidez y la integridad de las mismas (la plasmática y de los orgánulos celulares). Los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y las lipoproteínas son particularmente susceptibles al ataque del radical OH^\bullet , del oxígeno singlete y del hidroperoxilo, iniciando un proceso de lipoperoxidación autocatalítico. Este proceso genera hidroperóxidos que pueden alterar la membrana, o transformarse en hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos (malondialdehído, entre otros), los cuales pueden difundir lejos del lugar donde se originaron, ocasionando daños a otras macromoléculas.

- *Daño a glúcidos:* alteración de las funciones celulares asociadas a la actividad de las interleuquinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores.

De acuerdo a lo mencionado, las ROS pueden causar efectos destructivos y letales sobre los sistemas celulares (Philanto, 2006). Por otra parte, debe tenerse en cuenta que el organismo también utiliza a los radicales libres como mecanismo de defensa para la destrucción de bacterias y patógenos invasores.

→ Defensa antioxidante en el organismo.

El organismo humano posee varios mecanismos de defensa contra los radicales libres. Estos mecanismos se complementan mutuamente porque actúan sobre distintos oxidantes o en diferentes compartimientos celulares. Entre ellos se destacan: a nivel fisiológico, el sistema microvascular cuya función es mantener los niveles tisulares de O_2 siempre dentro de presiones parciales relativamente bajas y, a nivel bioquímico, la defensa antioxidante puede ser enzimática o no enzimática, así como sistemas reparadores de moléculas.

Sistema enzimático: Los organismos aerobios han desarrollado enzimas antioxidantes tales como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y DT-diaforasa, entre otras, que son dependientes de la presencia de oligoelementos tales como selenio, cobre, manganeso, zinc, que actúan como se muestra en la *Figura 5*.

La SOD, como ya se mencionó anteriormente, es la responsable de la reacción de dismutación del $\text{O}_2^{\bullet -}$ a H_2O_2 , que en reacciones posteriores catalizadas por la catalasa o por

la GPx se detoxificará formando H₂O y O₂. La catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas, y su principal función es eliminar el H₂O₂ generado en la beta-oxidación de los ácidos grasos, mientras que la GPx degradará el H₂O₂ citoplasmático (Muñiz y col., 2000).

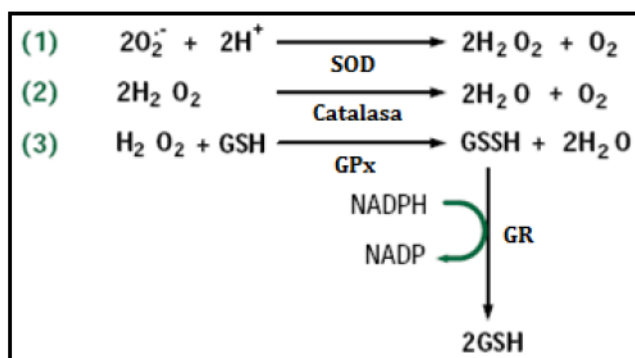


Figura 5.- Mecanismos de acción de ciertas enzimas que actúan como "antioxidantes" en los organismos aerobios.

Sistema no enzimático: Las células utilizan una serie de compuestos de baja masa molecular que pueden actuar como "scavengers" (captadores de radicales libres) por diversos mecanismos, siendo uno de los más importantes la donación de un átomo de hidrógeno. Ejemplos de ellos son los carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, licopeno) que actúan en los compartimentos más hidrofóbicos en los que penetran con gran facilidad; el licopeno, por ejemplo, es uno de los mejores neutralizadores del oxígeno singulete. El ácido ascórbico (vitamina C) tiene un efecto similar a la catalasa, desdoblando el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; el α -tocoferol (vitamina E) protege la integridad de las membranas celulares, además de poder neutralizar el oxígeno singulete $^1\text{O}_2$. También pueden mencionarse: la cisteína, la ferritina, la ceruloplasmina -principal inhibidor sérico de la peroxidación lipídica-, el glutathion reducido (GSH) que posee un grupo -SH que le permite atenuar el efecto de los radicales libres, el selenio, el manganeso y el zinc, la ubiquinona, el ácido úrico que neutraliza eficazmente radicales hidroxilo y peroxilo y puede prevenir la oxidación del ácido ascórbico, ciertos flavonoides y algunos compuestos polifenólicos (antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos) y proteicos, como más representativos e importantes (Anderson y col., 2000; Friedman, M., 1994; Williams y col., 1989; Zhang y Omaye, 2001).

Sistemas reparadores: se subdividen en dos grandes grupos, los directos y los indirectos:

- Sistema reparador directo: reducción de los grupos (S-S) de los aminoácidos azufrados de las proteínas por enzimas específicas como la disulfuro reductasa y la sulfóxido reductasa.
- Sistema reparador indirecto: primero se reconoce el daño molecular eliminándolo o degradándolo, y luego se sintetiza la parte eliminada. Esto ocurre tanto en las proteínas oxidadas y peróxidos lipídicos, como en las oxidaciones del DNA y RNA.

→ Estrés oxidativo y sus consecuencias.

El término *estrés oxidativo* hace referencia al desequilibrio entre la generación o presencia de especies oxidantes (radicales libres y otras especies reactivas) y la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante del organismo para hacer frente a la agresión oxidativa y sus efectos adversos (Mayne, 2003). Dicho desbalance puede deberse a un efecto de depleción de antioxidantes endógenos, a una incorporación dietaria insuficiente de antioxidantes y/o a una aumentada producción de especies reactivas como consecuencia de ciertas circunstancias anormales como inflamación, isquemia, la presencia de iones catalíticos, etc.

Frente al estrés oxidativo el organismo humano cuenta con diferentes mecanismos que actúan sobre diversos compuestos oxidantes y/o en diferentes compartimentos celulares: algunos son antioxidantes enzimáticos y otros son moléculas de bajo peso molecular que tienen la habilidad de secuestrar radicales libres, de inhibir la iniciación o propagación de reacciones oxidativas o de quelar metales de transición involucrados en muchas de las reacciones de oxidación (Noguchi y col., 2000). En determinadas ocasiones, estos sistemas pueden resultar insuficientes, desencadenándose diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos.

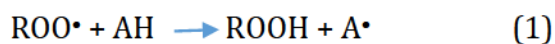
Entre los procesos más importantes asociados al estrés oxidativo se encuentran los procesos de envejecimiento celular, aun en condiciones no patológicas el daño oxidativo es parcialmente responsable del envejecimiento natural de las células. También se asocia a muchas enfermedades crónicas (Wei y Lee, 2002), como las enfermedades cardiovasculares relacionadas principalmente con la oxidación de las LDL, el cáncer (Collins y col., 2005), las cataratas, disfunciones del sistema inmunitario, y las

enfermedades degenerativas del sistema nervioso, tales como las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer (Halliwell, 2001; Liu y col., 2001).

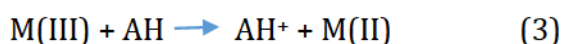
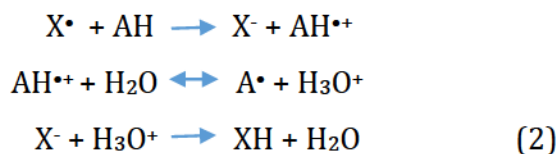
Estudios epidemiológicos han demostrado una correlación inversa entre el desarrollo de estas enfermedades crónico-degenerativas y el consumo de dietas ricas en frutas y vegetales. Los efectos protectores de estos alimentos están asociados a la presencia de sustancias antioxidantes. Por ello la ingestión de antioxidantes a través de la dieta tiene una importante función en la prevención de estas enfermedades (Berg y col., 1999).

Mecanismo general de acción de los antioxidantes.

Por lo general, las reacciones de oxidación incluyen etapas de iniciación, propagación y terminación. Todo el proceso ocurre mediante reacciones en cadena que se van desarrollando a través de la formación de radicales libres. Los antioxidantes, por lo tanto, se suelen clasificar en dos grandes grupos: aquellos que inhiben o retardan la formación de radicales libres a partir de su precursor inestable, es decir, que inhiben el proceso de iniciación, denominados antioxidantes “preventivos” o antioxidantes secundarios; y aquellos que interrumpen la reacción radicalaria en cadena, es decir, la propagación, y se suelen denominar antioxidantes “chain-breaking”, “interruptores de la cadena de reacciones” o antioxidantes primarios. Estos últimos son los antioxidantes más estudiados y su mecanismo de acción suele ser la transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) (hydrogen-atom transfer), donde la fuerza impulsora de esta transferencia es la formación de radicales deslocalizados “estables” que hacen que se interrumpan las reacciones en cadena de los radicales o que continúen con baja eficiencia. Específicamente, un antioxidante de este tipo (HAT) lo que hace es donar su átomo de hidrógeno débil a un radical ROO^\bullet (reacción 1), de una manera mucho más rápida de lo que el radical ROO^\bullet puede reaccionar con un sustrato. El radical A^\bullet , que se forma como producto de la reacción entre el antioxidante AH y ROO^\bullet , es estable y no es capaz de continuar con la autooxidación de la cadena, entonces la reacción se detiene. Este mecanismo HAT ha sido extensamente estudiado y ha sido ampliamente aceptado como el mecanismo predominante de protección frente a la oxidación iniciada por ROS (Wright y col., 1997; Vinqvist y Barclay, 2000).



Por el contrario, en las reacciones de transferencia de electrones SET (single electron transfer) el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto, incluyendo carbonilos, radicales (*reacción 2*) y metales (*reacción 3*).



Las reacciones HAT vienen determinadas por la entalpía de disociación, de manera que en aquellos compuestos donde este parámetro presente un bajo valor, será más fácil la abstracción de un átomo de hidrógeno. Asimismo, se ha observado que ciertos aspectos estructurales, como la presencia de un grupo hidroxilo en posición orto o la posible formación de enlaces intermoleculares entre distintos sustituyentes, pueden contribuir a reducir la entalpía de disociación, facilitando la formación de un radical estable. Por el contrario, en aquellas reacciones en las que está en juego la transferencia de electrones, será determinante el valor del potencial de ionización (Siquet y col., 2006).

3.- Oxidación lipídica.

Las reacciones de autooxidación de los lípidos (no enzimática) pueden dividirse en tres etapas principales: iniciación, propagación y terminación (*Figura 6*). Se trata de un proceso autocatalítico, es decir, una vez iniciado, la reacción se autopropaga y autoacelera. Pequeñas cantidades de compuestos pro-oxidantes y antioxidantes causan cambios significativos en la velocidad de reacción (Shaich, 2005).

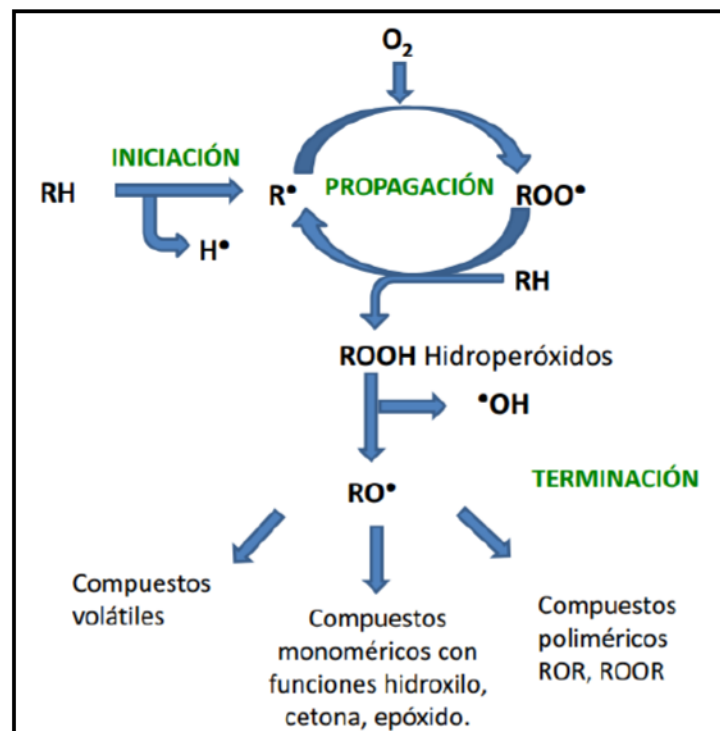


Figura 6.- Etapas de la oxidación lipídica (Márquez-Ruiz, 2008).

Iniciación

La oxidación directa de los lípidos insaturados por el oxígeno triplete (la forma más estable del oxígeno) es termodinámicamente desfavorable, dado que los dobles enlaces de los ácidos grasos se encuentran en estado singulete y tal reacción no cumpliría con la regla de la conservación del spin. En función de ello, la producción de los primeros radicales debe ser catalizada. En presencia de factores de iniciación o iniciadores (I), los lípidos insaturados (RH) pierden un radical hidrógeno (H^{\bullet}) de la posición α con respecto a los dobles enlaces del ácido graso para formar un radical libre lipídico (R^{\bullet}).

Los iniciadores pueden producir radicales por disociación térmica de hidroperóxidos presentes tales como impurezas, o por descomposición de hidroperóxidos catalizada por metales o exposición a la luz.

Por otra parte, el oxígeno singulete puede reaccionar con los ácidos grasos insaturados con mucha mayor velocidad que el oxígeno triplete generando hidroperóxidos, los cuales pueden servir como iniciadores de las reacciones anteriores. La vía más común de generación del oxígeno singulete es la fotosensibilización de los pigmentos naturales presentes en los alimentos, tales como clorofila, hemoglobina y mioglobina (Frankel, 2005).

Propagación

El radical libre lipídico (R^\bullet) reacciona muy rápidamente con el oxígeno molecular para formar radicales peroxilo (ROO^\bullet). Esta reacción es mucho más rápida que la siguiente, en la cual se transfiere un hidrógeno de otra molécula lipídica RH para dar un hidroperóxido $ROOH$ y otro radical R^\bullet .

La susceptibilidad de los lípidos a la autooxidación depende de la disponibilidad y de la relativa facilidad de los hidrógenos alílicos para reaccionar con los radicales peroxilo. Debido a la estabilización por resonancia de las especies R^\bullet , pueden formarse hidroperóxidos isoméricos. Los hidroperóxidos son los productos primarios fundamentales de la oxidación lipídica, dado que son relativamente inestables y participan en numerosas reacciones posteriores. En los primeros estadios de la autooxidación, su velocidad de formación excede a la velocidad de descomposición, mientras que en los últimos se registra la relación inversa (Frankel, 2005).

Terminación

En esta etapa del proceso oxidativo, luego de alcanzar un máximo, la velocidad disminuye, los radicales peroxilo reaccionan unos con otros formando productos no radicalarios tales como cetonas, epóxidos, alcoholes, monómeros, dímeros y polímeros, conocidos como compuestos secundarios.

Los hidroperóxidos pueden sufrir reacciones tales como la homólisis catalizada por metales o calor, generando radicales peroxilo y alcoxilo que pueden continuar la cadena amplificando el proceso de oxidación, o bien formar productos finales no radicalarios (Tironi, 2005).

Otras reacciones de terminación involucran la condensación de radicales peroxilo (ROO^\bullet), alcoxilo (RO^\bullet) o alquilo (R^\bullet), siendo dependientes de la presión de oxígeno y de la temperatura.

Descomposición de los hidroperóxidos.

Los hidroperóxidos generados sufren una posterior descomposición mediante rutas de reacción complejas que conducen a la formación de una mezcla de sustancias monoméricas, poliméricas y volátiles de bajo peso molecular (productos secundarios) (Nawar, 1996). Cada hidroperóxido produce un conjunto de productos de degradación

típicos y específicos, dependiendo de la posición del grupo peróxido en la molécula. Estos productos pueden a su vez sufrir posteriores oxidaciones y descomposiciones, contribuyendo a un gran “pool” de radicales libres (Frankel, 2005).

→ Factores que afectan la velocidad de auto-oxidación lipídica.

Los lípidos insaturados pueden sufrir procesos de deterioro durante el procesamiento, almacenamiento y/o manipulación de los alimentos. Estos procesos pueden dar origen a compuestos tóxicos o indeseables desde el punto de vista de la calidad organoléptica del producto y afectar tanto las propiedades funcionales de sus componentes, como su valor nutricional (Tironi, 2005; Guiotto, 2014).

Diversos factores relacionados con los ácidos grasos presentes, las características físicas y químicas del alimento, así como también la presencia de otros componentes tienen efecto sobre el proceso de oxidación lipídica. A continuación se enumeran y describen los principales factores involucrados.

a) Composición de ácidos grasos. El número, posición y geometría de los dobles enlaces afecta la velocidad de oxidación. Las menores energías de disociación asociadas a hidrógenos unidos a carbonos se encuentran entre dobles enlaces adyacentes (Nawar, 1996). Por lo tanto, éstos son los sitios más favorecidos termodinámicamente para ser atacados por los radicales peroxilo, por ello a mayor grado de insaturación la velocidad de oxidación será mayor. Por otra parte, los isómeros *cis* (mayoritarios en los alimentos) se oxidan más rápidamente que los *trans*, la longitud de la cadena del ácido graso no tiene efecto aparente en la velocidad o extensión de la formación de radicales y los ácidos grasos libres se oxidan a mayor velocidad que los esterificados.

b) Concentración de oxígeno. En condiciones de alta concentración de oxígeno (condiciones atmosféricas), la velocidad de oxidación es independiente de la misma; pero a muy bajas concentraciones, la velocidad es aproximadamente proporcional a esta variable (Davidovich y col., 1980).

c) Temperatura. La velocidad de las reacciones asociadas con la oxidación lipídica aumentará en función del aumento de la temperatura. La temperatura ejerce un efecto tanto sobre la presión parcial de oxígeno así como también disminuyendo la solubilidad del oxígeno.

d) Área superficial. La velocidad de oxidación se incrementará proporcionalmente al área superficial expuesta de los lípidos.

e) Humedad. En alimentos con muy baja actividad acuosa ($a_w < 0,1$) la oxidación ocurre a una elevada velocidad. Luego, a medida que la a_w aumenta hasta aproximadamente 0,3, la velocidad disminuye alcanzando un mínimo, para incrementarse nuevamente a mayores valores de a_w (Labuza y col., 1972).

f) Agentes pro-oxidantes. La presencia de trazas de metales de transición, tales como el cobre y el hierro, producen un efecto de catálisis sobre el proceso de oxidación lipídica, favoreciendo la formación de radicales libres (Frankel, 2005).

g) Energía radiante. Tanto la radiación visible, ultravioleta como gamma son promotoras de la oxidación lipídica (Frankel, 2005).

h) Agentes antioxidantes. Respecto a la secuencia de reacciones que ocurre durante la oxidación lipídica, los antioxidantes pueden actuar mediante distintos mecanismos de acción: a) disminuyendo la concentración de oxígeno, b) interceptando al oxígeno singulete, c) atrapando ("scavenging") radicales libres tales como los radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), d) por unión con metales (agentes pro-oxidantes), e) favoreciendo la descomposición de productos primarios a compuestos no radicalarios, f) por interrupción de los procesos de iniciación o propagación, transfiriendo átomos de hidrógeno a los radicales lipídicos y peroxilo (Shahidi, 1997; Frankel, 2005).

Como ya se mencionó anteriormente, se clasifican, según su mecanismo de acción, en dos categorías: los antioxidantes preventivos y los que interrumpen la reacción en cadena (Klimczak y Pcholek, 2002). Los antioxidantes que interrumpen la reacción oxidativa en cadena (chain-breaking), secuestran los radicales importantes en la etapa de propagación, como el radical alcoxilo ($\text{RO}\cdot$) y peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), inhibiendo esta etapa del proceso oxidativo. Pueden destacarse entre ellos, ácido ascórbico, tocoferoles, ácido úrico, bilirrubina, compuestos fenólicos, entre otros (Matthäus, 2002). Actuando a través de la transferencia de átomos de hidrógeno o de electrones (Ou y col., 2002).

Dadas las implicancias de los procesos oxidativos, es importante su inhibición tanto a nivel de los alimentos como del organismo humano. Tiempo atrás, la incorporación de antioxidantes sintéticos era ampliamente utilizada en el procesamiento de alimentos,

siendo los más empleados butil-hidroxitolueno (BHT), butil-hidroxianisol (BHA) y ter-butil hidroquinona (TBHQ); sin embargo, se ha demostrado que dichos antioxidantes poseen actividad carcinogénica (Lindberg-Madsen y Bertelsen, 1995). En función de esto y de la creciente tendencia de consumo de productos saludables, la demanda de antioxidantes se ha orientado hacia el empleo de productos naturales. Se ha demostrado la presencia de numerosos compuestos antioxidantes en vegetales, especialmente productos secundarios tales como compuestos fenólicos y polifenólicos, fitoesteroles, carotenoides, y también compuestos derivados de proteínas.

4.- Péptidos bioactivos y antioxidantes de naturaleza proteica.

Las proteínas de la dieta aportan los aminoácidos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de las células y los tejidos de nuestro organismo. Las mismas pueden además contener secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño que se encuentran encriptadas y que al liberarse constituyan *péptidos bioactivos*. Dichos péptidos pueden ser liberados por hidrólisis, ya sea por hidrólisis enzimática *in vitro* durante el procesamiento de los alimentos; como producto de la actividad de ciertos microorganismos, por ejemplo, durante las fermentaciones; o como resultado de la hidrólisis gastrointestinal que sufren al ser digeridos por el organismo de los individuos. En la actualidad cada vez es mayor el interés por estos péptidos que, además de su valor nutricional, presentan cierta actividad biológica, regulando procesos fisiológicos. Existen evidencias que demuestran que algunos péptidos son capaces de atravesar el epitelio intestinal y afectar los principales sistemas: cardiovascular, nervioso, gastrointestinal e inmune (*Figura 7*).

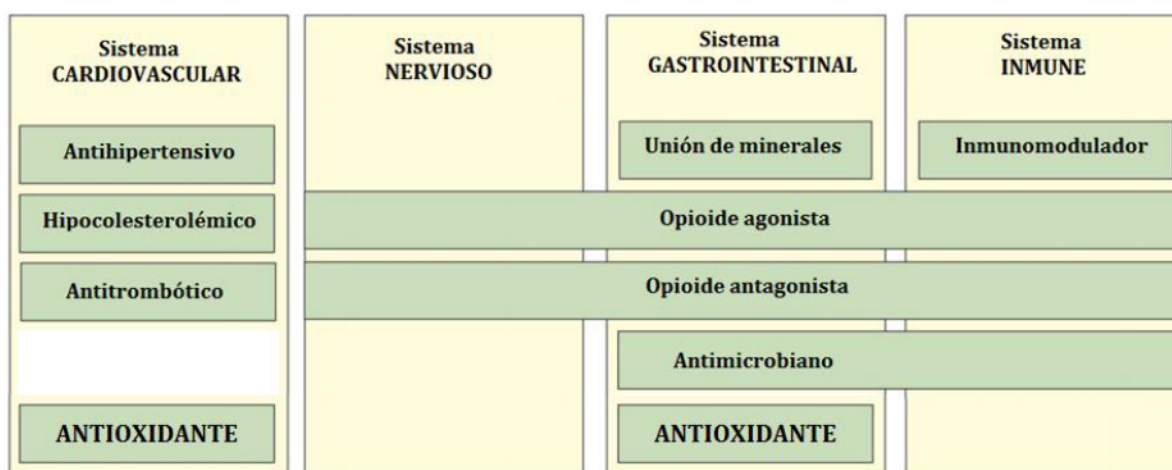


Figura 7.- Sistemas sobre los que podrían actuar los diferentes péptidos bioactivos.

(Hartmann y Meisel, 2007).

Se han podido aislar, identificar y secuenciar péptidos con actividad antimicrobiana, antitrombótica, antihipertensiva, hipocolesterolémica, antioxidante, inmuno y citoreguladora, entre otros. En la *Tabla 1* se muestran algunos de los principales efectos beneficiosos que pueden producir estos péptidos.

*Tabla 1.- Principales efectos beneficiosos producidos por péptidos
(Vioque y col., 2006).*

Péptidos	Efecto beneficioso
Inmunomoduladores	Estimulan la respuesta inmune.
Antihipertensivos	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento.
Reguladores del tránsito intestinal	Mejoran la digestión y absorción.
Reguladores de la proliferación celular	Reducen la proliferación de tumores cancerígenos.
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones.
Quelantes	Mejoran la absorción de minerales y metales.
Hipocolesterolémicos	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.
Antitrombóticos	Reducen los riesgos de padecer trombos.

A continuación se citan algunos ejemplos de péptidos bioactivos liberados como producto de la hidrólisis, con diferentes efectos beneficiosos. Se ha comprobado que las proteínas y péptidos de trigo sarraceno estarían relacionados con varios efectos beneficiosos entre los que se encuentran la actividad hipocolesterolémica (Kayashita y col., 1997), antitumoral (Liu y col., 2001), reguladora de la presión sanguínea (Ma y col., 2006) y antioxidante (Ma y col., 2009). Diferentes matrices proteicas como las de los moluscos (Jung y col., 2007), caseínas (Hernandez Ledesma, 2004), prolaminas del maíz (Zhu y col., 2008) y ciertas ostras (Qian y col., 2008) poseen una mayor capacidad secuestrante de radicales libres luego de una digestión gastrointestinal simulada *in vitro* con pepsina y pancreatina. Se ha encontrado que en la soja, luego de una digestión enzimática y/o microbiana se logran liberar péptidos con probada actividad antitrombótica, antihipertensiva y antioxidante (Gibbs y col., 2004). Baró y col. (2001) han demostrado que tanto en la leche humana como la vacuna luego de una hidrólisis enzimática se liberan péptidos con actividad opiácea,

antihipertensiva, inmunomoduladora, antitrombótica, moduladora de la función motora gastrointestinal y antimicrobiana.

Proteínas e hidrolizados proteicos de diversas fuentes han mostrado tener actividad antioxidante (Chen y col., 1996 y 1998; Wang y Xiong, 2005; Sakanaka y col., 2004; Je y col., 2005; Mendis y col., 2005). Por ejemplo, hidrolizados de albúmina de huevo y yema de huevo (Sakanaka y col., 2004), caseína (Suetsuna y col., 2000), suero lácteo (Peña Ramos y col., 2004), elastina, gelatina de pescado (Kim y col., 2001), gluten de trigo (Zhu y col., 2006), quinoa (Aluko y Monu, 2003), lupín (Yoshie-Stark y col., 2004), soja y proteína miofibrilar han demostrado inhibir la oxidación de lípidos y ácidos grasos insaturados en diferentes sistemas modelos (Wang y Xiong, 2005). La carnosina es un dipéptido que surge de la hidrólisis natural de productos cárnicos que actúa como secuestrador de radicales libres y como inhibidor de la iniciación de la oxidación lipídica originada por especies reactivas del oxígeno (Bodyrev y Johnson, 2002), por inactivación de especies oxígeno singulete por la histidina presente (Mendis y col., 2005; Wang y col., 2006); también se han demostrado propiedades antioxidantes en hidrolizados proteicos de canola (Cumby y col., 2008) y en hidrolizados de proteínas animales (Kim y col., 2001), entre otros.

Los aminoácidos son conocidos como efectivos antioxidantes primarios (Sakanaka y col., 2004). Varios aminoácidos, como tirosina, metionina, histidina, lisina y triptófano son generalmente aceptados como antioxidantes a pesar de sus efectos pro-oxidativos en algunos casos (Peña Ramos y col., 2004). Según Wang y Xiong (2005), los residuos de cisteína y triptófano presentes en la proteína de papa y liberados luego de la hidrólisis, podrían actuar como antioxidantes. Se ha observado que la presencia de algunos aminoácidos como leucina, histidina, tirosina y metionina mejoran la actividad secuestrante de radicales libres de ciertos péptidos (Park y col., 2001). A partir de estudios con péptidos sintéticos se ha demostrado que la presencia de histidina y prolina jugaría un rol importante en la actividad antioxidante de los mismos (Peña Ramos y col., 2004). Especialmente la histidina presenta una fuerte actividad secuestrante de radicales libres, debido a su habilidad de donar protones del grupo imidazol (Mendis y col., 2005; Wang y col., 2006). Chen y col. (1998) diseñaron péptidos sintéticos conteniendo histidina para examinar la relación entre este residuo y la actividad antioxidante. Estos autores concluyeron que su presencia en el péptido es decisiva para la actividad antioxidante. De acuerdo con Cumby y col. (2008), la presencia de aminoácidos aromáticos afecta la capacidad antioxidante de un péptido, en particular en la tirosina el grupo hidroxilo es

capaz de donar hidrógeno y estabilizar radicales libres. Además se puede esperar que un péptido con mayor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos presente un mayor potencial antioxidante debido a la mayor interacción con los ácidos grasos (Mendis y col., 2005).

En diversos trabajos se han obtenido y aislado péptidos bioactivos a partir de diferentes fuentes proteicas, y se ha determinado la secuencia de aminoácidos responsables de la actividad antioxidante; de los resultados de dichas investigaciones se puede destacar que tanto la composición de aminoácidos como la secuencia de los péptidos son críticas para su actividad antioxidante. Según Chen y y col. (1998), los péptidos antioxidantes pueden actuar como quelantes de iones metálicos, inhibidores de oxígeno singulete o secuestradores de radicales hidroxilos, siendo su secuencia primaria muy importante para que los mismos presenten esta actividad.

5.- Amaranto.

El amaranto es un cultivo autóctono de Centroamérica. Es un vegetal de crecimiento rápido, con hojas anchas, de diferentes tamaños y colores que suelen variar desde el verde oscuro al magenta. Sus flores también son de diversos colores brillantes como el púrpura, el naranja, el rojo y el dorado (*Imagen 8*). Su forraje es particularmente rico en carotenoides, proteínas, hierro y calcio (Prakash y Pal., 1991), además de poseer cantidades importantes de vitamina C.



Imagen 8.- Distintas variedades de amaranto.

El género *Amaranthus* - familia Amaranthaceae - está constituido por diversas especies, siendo cultivables sólo algunas de ellas. Es considerado como un pseudocereal, ya que si bien comparte ciertas características con los cereales, pertenece a las dicotiledóneas. Por lo cual, a pesar de las cantidades importantes de almidón almacenadas en el perisperma que posee, no se lo puede considerar como un cereal verdadero. Pertenece al grupo de plantas

C4 que tienen una modalidad fotosintética de alta eficiencia en el aprovechamiento de la radiación solar y la fijación de CO₂, lo que les permite aumentar su productividad y hacer un eficiente uso del agua, pudiendo adaptarse a condiciones agroclimáticas adversas, tales como la sequía, las altas temperaturas, los suelos salinos y diversas plagas (Segura Nieto y col, 1994; Aphalo y col., 2004).

Las semillas son pequeñas, con un diámetro entre 1 y 2 mm, su color varía del blanco al negro, pasando por el dorado y morado, dependiendo de la especie de la que provengan (*Imagen 9*). Su contenido de proteínas es de 12 a 22 %, mayor al que presenta el trigo (12 - 14 %), el arroz (7 - 10 %) y el maíz (9 - 10 %) (Becker, 1989; Breene, 1991; Barba de la Rosa y col., 1992; Segura-Nieto y col., 1992; Tosi y col., 2001; Escudero y col., 2004). Según la Organización Mundial de la Salud, el grano de amaranto presenta un buen balance aminoacídico, con un contenido importante de lisina (3,2 a 6,4 %), triptófano y aminoácidos azufrados (2,6 a 5,5 %) principalmente metionina, esenciales en la alimentación humana y que generalmente son limitantes en los cereales (Gorinstein y col., 2001; Segura Nieto y col., 1994). Diversos estudios realizados sobre sus proteínas han demostrado que la leucina es el principal aminoácido limitante, mientras que la valina, isoleucina y treonina se encuentran en valores cercanos a los requeridos en la dieta humana (FAO/WHO, 1973). Por otro lado, la calidad de proteínas no sólo depende de la composición de las mismas sino también de su biodisponibilidad. La digestibilidad proteica, la disponibilidad de la lisina y la utilización proteica neta de las proteínas de amaranto son definitivamente superiores a las de los cereales y similares a las de las caseínas (Salcedo-Chávez y col., 2002).



Imagen 9.- Semillas de amaranto.

El amaranto puede ser utilizado con diversos fines tanto en la alimentación humana y animal, como en la industria y en la medicina. Para la alimentación humana se utiliza el

grano entero o molido en forma de harina, con los granos tostados o hervidos. Las hojas tiernas reemplazan a las hortalizas de hoja y las plántulas también se utilizan para consumo. La planta en estado fresco se utiliza como forraje para la alimentación del ganado, sobre todo para combinar con otras especies forrajeras. También se utiliza para la producción de concentrados proteicos foliares debido a su alto rendimiento tanto en biomasa verde como de las proteínas (Bressani, 1994; Saunders y Becker, 1984). Además, las semillas hacen una excelente combinación con otros granos para alimentar aves de corral o para preparar cualquier otro tipo de alimento balanceado para uso animal. En la industria se utiliza para la obtención de pigmentos vegetales, rojo-violetas, denominados betacianinas, principalmente la amarantina y la isoamarantina que se utilizan para la coloración de alimentos (Cai y col., 1998). Dado su alto precio internacional y la relativa facilidad de su producción, se presenta como una buena alternativa de cultivo estival en nuestro país, especialmente para aprovechar suelos pobres, apareciendo como áreas potenciales de cultivo Jujuy, Santiago del Estero, Córdoba, San Luis, La Pampa y Buenos Aires (Luis Miguel y col., 2011).

Proteínas de la semilla de amaranto.

Si bien la semilla presenta tres grupos de proteínas - las estructurales, las biológicamente activas llamadas “housekeeping” y las de reserva o almacenamiento - estas últimas constituyen más del 80 % y son, por lo tanto, las que más influyen en la calidad nutricional proteica de la semilla. Las proteínas de almacenamiento son aquellas cuya velocidad de síntesis se incrementa durante el desarrollo de la semilla y que se acumulan en vesículas rodeadas de membrana denominadas cuerpos proteicos. Posteriormente, durante la germinación, estas proteínas son degradadas para proveer principalmente nitrógeno reducido y carbono con el fin de sostener el crecimiento del brote y el desarrollo inmediato luego de la germinación.

Osborne (1924) fue el primero en sistematizar estudios de las proteínas de plantas y en introducir una clasificación que se basa en la solubilidad de las proteínas en diferentes medios durante una extracción secuencial. Los grupos proteicos extraídos en cada una de las etapas se denominan “fracciones de Osborne” y son las siguientes: albúminas, solubles en agua; globulinas, solubles en soluciones salinas diluidas y neutras; prolaminas, solubles en alcohol o en mezclas alcohol-agua; y glutelinas, solubles en soluciones alcalinas o ácidas.

Las proteínas de almacenamiento del amaranto se han clasificado de acuerdo al método de Osborne, presentando ciertos inconvenientes debido a que cada grupo de investigación ha utilizado un método de aislamiento diferente, con lo que se dificulta una clasificación uniforme. Una de las fracciones más abundante es la de las albúminas (48,9 a 65 %); seguida en orden de abundancia por las glutelinas (22,4 a 42,3 %) y las globulinas (13,7 a 18,1 %). Las prolaminas son las proteínas que se encuentran en menor proporción en este pseudocereal, en concentraciones que oscilan entre un 1 y un 3,2 % (Konishi y col., 1991; Paredes Lopez y col., 1993). Los porcentajes y, por lo tanto, el orden de las distintas fracciones varían de acuerdo a la metodología aplicada para la extracción.

Albúminas.

Considerando la clasificación propuesta por Osborne en 1924, como ya se mencionó anteriormente, se denominan albúminas a aquellas proteínas que se extraen de la harina con agua. De acuerdo a los resultados obtenidos por Konishi y col. (1991) esta fracción se encontraría ubicada en el citoplasma de la célula, ya que es rápidamente degradada al someter a la harina a un tratamiento enzimático. La solubilidad de esta fracción proteica no se vio mayormente afectada por la presencia de diferentes cationes metálicos, se informaron valores por encima del 70 % de proteína soluble. Todos los autores coinciden en destacar como componentes principales de esta fracción polipéptidos con una masa molecular entre 10 y 40 kDa (Gorinstein y col., 1991; Segura Nieto y col., 1992). Además han sido caracterizados polipéptidos con masas moleculares mayores, hasta 94 kDa, aunque éstos se encuentran en menor proporción (Konishi y col., 1991; Barba de la Rosa y col., 1992; Segura Nieto y col., 1994; Martínez y Añón, 1996). Todas las descripciones sobre esta fracción proteica, coinciden en señalar que sus polipéptidos no se encuentran unidos por enlaces disulfuro. La estabilidad térmica encontrada para esta fracción proteica es baja, siendo su temperatura de desnaturalización de aproximadamente 60 °C, (Martínez y Añón, 1996; Gorinstein y col., 2001). La composición de aminoácidos de las albúminas presentó cierta variabilidad en los valores asignados a lisina (6,2 - 9,4 % p/p) y aminoácidos azufrados (4,1 - 9,7 % p/p) según distintos autores (Mora-Escobedo y col., 1990; Bressani y García Vela, 1990; Gorinstein y col., 1991; Konishi y col., 1991; Segura Nieto y col., 1992; Barba de la Rosa y col., 1992). En general, los componentes mayoritarios asignados a esta fracción son los aminoácidos azufrados, glutamina/ácido glutámico, y asparagina; mientras que los que se encuentran en menor proporción son leucina y treonina.

Dentro de la fracción albúminas, se han caracterizado algunas proteínas con diferente actividad biológica. Entre estas últimas, se encuentra un inhibidor de tripsina y uno de α -amilasa que han sido caracterizados y secuenciados por Valdés Rodríguez y col. (1993) y Lu y col. (1999) respectivamente. El inhibidor de tripsina, es un polipéptido de 7,4 kDa, con un pI = 7,5, con elevados contenidos de valina, arginina y ácido glutámico y no contiene metionina. En cuanto al inhibidor de α -amilasa (AAI), es una polipéptido de sólo 32 aminoácidos. Se determinó su estructura mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones H^1 NMR. Su estructura consta de tres hojas β antiparalelas unidas por enlaces disulfuro siguiendo un esquema característico para estos inhibidores. Ramírez Medeles y col. (2003) determinaron la secuencia de una proteína no específica transportadora de lípidos en *Amaranthus hypochondriacus*. Las proteínas no específicas transportadoras de lípidos pertenecen a la superfamilia de las prolaminas, su función biológica aún no ha sido dilucidada aunque se cree que jugarían un rol importante en la defensa de las plantas frente a condiciones de stress.

Globulinas.

La fracción globulinas es aquella que se extrae con soluciones salinas de fuerza iónica entre 0,5 M y 1,0 M y pH próximo a siete a partir del residuo que queda luego de la extracción de albúminas con agua. Para el amaranto se reconocen, al igual que en las leguminosas, dos tipos con diferente coeficiente de sedimentación, leguminas y vicilinas, la mayor parte de las globulinas de amaranto corresponden a las denominadas 11S y una fracción minoritaria a las 7S.

Globulina 7S

Es poco lo que se conoce acerca de la globulina 7S de amaranto. Aunque existen algunos estudios previos que hacen referencia a esta fracción proteica (Segura Nieto y col., 1992; Barba de la Rosa y col., 1992; Martínez y col., 1997), fue Marcone (1999) quien la purificó y estudió con más detalle. Esta globulina es un hetero-oligómero cuya masa molecular, determinada por cromatografía de exclusión molecular, es cercana a los 200 kDa. Su punto isoeléctrico está comprendido entre 5,2 y 5,8. El perfil electroforético de esta fracción determinó la existencia de un gran número de polipéptidos de masas moleculares comprendidas entre 15 y 90 kDa, que carecen de uniones disulfuro. Sólo unas pocas bandas son compartidas con la globulina 11S. Las masas determinadas para los polipéptidos de

globulina 7S son: 15, 24, 31, 35, 37, 40, 71 y 90 kDa (Barba de la Rosa y col. 1992; Martínez y col., 1997). El análisis de la estructura secundaria reveló la presencia de una baja proporción de estructura de α -hélice (aproximadamente 12%), siendo más importante la estructura de hoja- β (aproximadamente 50 %) (Marccone, 1999). De los estudios de estructura terciaria se puede inferir la presencia de aminoácidos aromáticos próximos a la superficie que tendrían una alta movilidad.

Globulina 11S

Dentro de la fracción globulinas, la globulina 11S es la que se encuentra en mayor proporción. En uno de los primeros ensayos enfocados a la caracterización de esta fracción se informó la presencia de un 81 % de globulina 11S en el extracto crudo de globulinas (Konishi y col., 1985). En coincidencia con este resultado, Marccone y Yada (1991 y 1998) encontraron un porcentaje similar al analizar siete líneas de amaranto genéticamente diferentes. En estado nativo, la globulina 11S forma un hetero-oligómero. La determinación de su masa por cromatografía de exclusión molecular, ha arrojado valores muy diferentes que van desde 166 hasta 440 kDa (Konishi y col., 1985; Barba de la Rosa y col., 1992). Otros grupos de investigación encontraron valores de aproximadamente 300 kDa (Segura Nieto y col., 1994; Martínez y col., 1997). Según informaran Marccone y Yada (1998), existe cierta diversidad en la masa molecular de la globulina 11S extraída de amarantos pertenecientes a diferentes líneas genéticas, estos autores encontraron masas moleculares comprendidas entre 237 y 381 kDa.

Gorinstein y col. (1991) describieron a la globulina 11S como formada por polipéptidos mayoritarios de masas moleculares entre 14 y 18 kDa. La abundancia de polipéptidos de bajo peso molecular y la ausencia de polipéptidos de alto peso molecular podría deberse, al menos en parte, al procedimiento de extracción utilizado. De un modo semejante a lo que ocurre en otras globulinas tipo 11S, se han detectado en amaranto, una pequeña proporción de agregados de masa molecular mayor a la informada para las moléculas de globulina 11S en estado nativo. Estos agregados están estabilizados por uniones disulfuro (Marccone y Yada, 1991 y 1998; Martínez y col., 1997). La composición de aminoácidos del extracto crudo de globulinas que comprende tanto a 7S como a 11S, fue determinada por varios autores (Konishi y col., 1985; Gorinstein y col., 1991; Barba de la Rosa y col., 1992), todos ellos coinciden en destacar a glutamina/ácido glutámico y asparagina/ácido aspártico como los aminoácidos principales encontrados en esta fracción. La presencia de

valores altos para estos aminoácidos parece ser una característica común en proteínas de reserva de semillas (Marccone y Yada, 1991). En términos de aminoácidos esenciales, las globulinas de amaranto poseen una proporción de aminoácidos azufrados y de lisina superior a la de las globulinas de avena y soja (Segura Nieto y col., 1994). Marccone y Yada (1998), determinaron que la estructura secundaria de la globulina 11S contenía un porcentaje de hoja β -plegada que variaba entre 35 y 71 %, con aproximadamente un 7 % de α -hélice y 18 % de giros β .

La globulina 11S se presenta una estructura cuaternaria hexamérica (*Figura 10*) formada por subunidades de masas moleculares entre 50 y 70 kDa que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada una de las subunidades, a su vez, está formado por un polipéptido ácido (peso molecular de 30 a 40 kDa) y un polipéptido básico (peso molecular alrededor de 20 kDa) unidas por enlace disulfuro (Adachi y col., 2001; Segura Nieto y col., 1994).

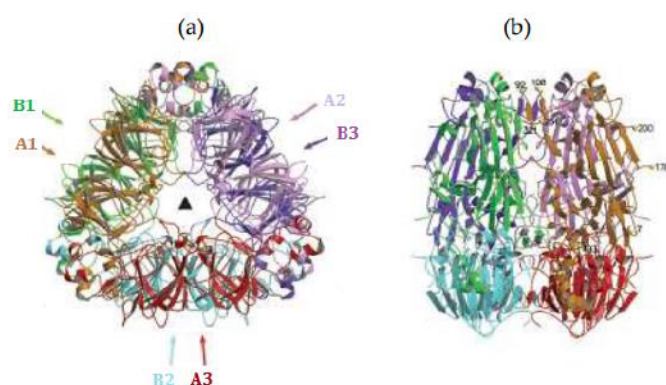


Figura 10.- Estructura del homohexámero de la globulina 11S (Adachi y col., 2003).

a) Se muestran los seis polipéptidos que la conforman (A1, A2 y A3, ácidos y B1, B2 y B3, básicos)

(b) Molécula rotada 90°.

Globulina-p

Konishi y col. (1991) describieron una fracción proteica que era extraída con agua en una etapa posterior a la extracción de globulinas y albúminas-1, descritas anteriormente. Estos autores denominaron a la nueva fracción proteica albúminas-2. Según los datos informados por Konishi y col. (1991), las albúminas-2 se solubilizan en agua o en soluciones salinas de baja fuerza iónica (concentración de NaCl menor a 0,1 N). Su punto isoeléctrico aparente está entre 5 y 6. A diferencia de las albúminas-1, esta fracción está formada por 5 polipéptidos de masas moleculares: 22, 26, 31, 36 y 56 kDa. Las masas de los

polipéptidos que constituyen a la fracción albúmina-2 son similares a las de los polipéptidos que forman la fracción globulinas excepto por la abundante cantidad del polipéptido de 56 kDa. El aminoácido más importante que integra a las albúminas-2 es el ácido glutámico/glutamina (Glx). Al comparar ambas fracciones de albúminas, las albúminas-2 son más ricas en prolina, serina, arginina, histidina y fenilalanina y menos en lisina, metionina, cisteína y valina. La resistencia al ataque de pronasa que ofrece la fracción albúmina-2, a diferencia de lo que se observa para albúmina-1 cuando la harina es tratada con dicha enzima, permitió sugerir a Konishi y col. (1991) que la primera se encontraría resguardada en cuerpos proteicos, dato que fuera confirmado posteriormente por Nakamura y col. (1998). En nuestro laboratorio, se aisló una fracción proteica con características de extracción similares a las descritas por Konishi y col. (1991) para la fracción albúmina-2. El perfil de polipéptidos obtenido en condiciones no reductoras fue similar al de la globulina 11S (Martínez y col., 1997) y al analizarla en presencia de un agente reductor, se observó un perfil equivalente al informado para albúminas-2 (Konishi y col., 1991).

Una particularidad de esta proteína es su capacidad para formar y estabilizar agregados de alto peso molecular (600-1500 kDa) (Castellani, 2000), sólo una pequeña proporción de sus moléculas está libre, para las cuales se ha determinado una masa molecular próxima a 300 kDa (Martínez y col., 1997, Castellani, 2000) siendo esta otra característica que comparte con globulina 11S.

Evaluando todas estas características se propuso para esta fracción la denominación de globulina polimerizada (globulina-p). Se ha determinado que los agregados característicos de globulina-p se encuentran parcialmente estabilizados por enlaces disulfuro (Martínez y col., 1997). Al aislar esta proteína en presencia de bajas concentraciones de un agente reductor (2-mercaptoetanol, 20 mM) y analizarla por cromatografía de exclusión molecular utilizando la misma concentración del agente reductor, se observó una disminución en la cantidad de agregados. La globulina-p parcialmente purificada presentó una elevada estabilidad térmica, con una Td = 94,0 °C (Martínez y col., 1997). Al analizar la respuesta de esta fracción proteica cuando es sometida a diferentes condiciones de pH (Castellani y col., 1998) se encontró una región de máxima estabilidad térmica en una zona de pHs cercana a la neutralidad (pH 6,0 - 8,0). Mientras que a pHs extremos, la fracción globulina-p se encuentra desnaturalizada, siendo esta desnaturalización más importante en la zona ácida. Utilizando un método alternativo de extracción secuencial, Chen y Paredes López (1997)

obtuvieron una fracción proteica que clasificaron como globulina 11S. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas y la composición polipeptídica mostraron rasgos en común con globulina-p (Romero Zepeda y Paredes Lopez, 1996). Gorinstein y col. (2001) analizaron esta fracción proteica no purificada mediante fluorescencia intrínseca (FI) y dicroísmo circular (DC) en condiciones nativas, asignándole una mayor exposición de los residuos de triptófano en la superficie y una mayor hidrofobicidad superficial en comparación con otras globulinas. En cuanto a la estructura secundaria de globulina-p determinada por dicroísmo circular, se encontró aproximadamente un 15 % de α hélice, 25 % de hoja β y el resto correspondió a estructura sin periodicidad. Cuando globulina-p fue tratada con papaína (Castellani y col., 2000) los polipéptidos con masa molecular 56 kDa (M) y los polipéptidos ácidos (A) fueron atacados en mayor medida por la enzima mientras que las subunidades básicas conservaron el mismo tamaño. Estos resultados permitieron sugerir a los autores que tanto A como M estarían localizados en la superficie de la molécula. Estudios inmunoquímicos realizados sobre esta fracción proteica por Aphalo y col. (2004), revelaron que la moléculas de globulina-p y sus agregados tienen superficies reactivas similares. Por otra parte el polipéptido de 56 kDa fue el de mayor reactividad, seguido por los polipéptidos ácidos. Globulina-p presentó reacción cruzada con las restantes fracciones de amaranto, siendo la globulina 11S la más reactiva. También se observó reacción cruzada con globulinas de quinoa y en menor grado con globulinas de girasol y arroz. Estudios recientes realizados por Molina y col. (2008) demostraron que el polipéptido característico de globulina-p de 56 kDa se trata de una subunidad no procesada aunque posee el sitio de corte característico asparagina-glicina presente en las globulinas 11S y ha sido demostrado que existe actividad de la enzima de procesamiento vacuolar tanto en semillas de amaranto en desarrollo como en semillas maduras. De este modo, los resultados obtenidos por estos autores, no han podido esclarecer cual es la causa de la presencia del precursor no procesado en las semillas maduras.

Prolaminas.

La fracción prolaminas comprende a las proteínas solubles en soluciones alcohólicas, en general se utiliza una concentración de 70 % de isopropanol para su extracción. Gorinstein y col. (1991) analizaron diferentes condiciones de extracción, encontrando que el rendimiento máximo de prolaminas (2,1 %) se obtiene usando 55 % de isopropanol y 5 % de 2-mercaptoetanol. Aunque Bressani y García-Vela (1990), informaron un rendimiento de 7,3 % utilizando la misma concentración de alcohol sin el agente reductor. El valor

máximo informado para el rendimiento de esta fracción fue del 11 % (Duarte Correa y col., 1986). A pesar de las diferencias, todos los autores encuentran a esta fracción como la minoritaria. Existen también algunas discrepancias en cuanto a las masas de los polipéptidos principales que forman a las prolaminas de amaranto. Gorinstein y col. (1991) informaron que las bandas mayoritarias tienen una masa entre 10 y 14 kDa y en menor proporción una de 20 kDa. Segura Nieto y col. (1992) encontraron tres bandas principales a 16, 18 y 22 kDa y dos bandas menores debajo de 12 kDa. Por otra parte, Barba de la Rosa y col. (1992) informaron que en ausencia de un agente reductor, se observan bandas de alto peso molecular que en presencia del agente reductor, se transforman en 67, 34 y 22 kDa. Estas diferencias podrían explicarse en parte por los cambios que sufren las prolaminas de acuerdo al solvente empleado para el desgrasado de la harina (Segura Nieto y col., 1994) y a las condiciones que se utilizan para su extracción. Dentro de los aminoácidos esenciales, la treonina y la leucina (Segura Nieto y col., 1992) son los que se encuentran en mayor proporción en estas prolaminas, al igual que los aminoácidos azufrados y la fenilalanina (Barba de la Rosa y col., 1992). Las características estructurales e inmunoquímicas de las prolaminas de amaranto están alejadas de las gliadinas de trigo, cebada y centeno, por lo que no presentan contraindicación en pacientes celíacos.

Glutelinas.

Las glutelinas constituyen la fracción proteica más insoluble obtenida a partir de harina de semillas, sólo son extraídas en condiciones drásticas de pH. Generalmente se utiliza buffer borato de pH = 10 y en algunos casos se agregan detergentes y/o agentes reductores para aumentar el rendimiento de extracción (Segura Nieto y col., 1994; Paredes López y col., 1993). También se utiliza NaOH 0,1 N para la extracción de esta fracción con el que se obtiene un rendimiento mayor (Abugoch y col., 2003). Existe una importante variabilidad en los datos informados por distintos autores para el rendimiento de extracción de esta fracción abarcando un rango entre 7 y 56 %. En cuanto a su composición aminoacídica, el ácido glutámico/glutamina es el aminoácido más abundante, le siguen arginina, leucina, fenilalanina y tirosina (Bressani y García Vela, 1990). Se ha determinado su composición polipeptídica en varias condiciones (Vasco Méndez y Paredes López, 1995; Segura Nieto y col., 1994, Martínez y col., 1997). Su perfil electroforético es similar al descrito para globulina-p de amaranto (Martínez y col., 1997; Abugoch y col., 2003). En condiciones no reductoras las principales bandas detectadas para esta fracción se encuentran entre 50-67, 30-38 y 20-28 kDa, además de algunas de mayor masa molecular que no entran en el gel de

separación. En presencia de un agente reductor como el 2-mercaptoetanol, se encontraron polipéptidos de masa molecular similar a los de globulinas, se detectó una banda entre 54-60 kDa, y entre dos y tres bandas en las regiones de 35-38 kDa y 24-26 kDa, junto con una baja proporción de polipéptidos agregados (Gorinstein y col., 1998 y 1991; Barba de la Rosa y col., 1992; Martínez y col., 1997). La disminución de los agregados de alta masa molecular al pasar de condiciones no reductoras a condiciones reductoras indicó que estaban formados y estabilizados por uniones disulfuro (Abugoch y col., 2003). Estos autores encontraron cierto grado de plegamiento para las glutelinas de amaranto cuando eran extraídas con buffer borato (pH = 10), mientras que están completamente desnaturalizadas cuando se extraen con NaOH 0,1 N. Estudios inmunoquímicos han determinado la existencia de cierta homología entre las subunidades ácidas de globulinas y los polipéptidos de 32 y 60 kDa de glutelinas de amaranto. Además se determinó cierto grado de homología entre estos polipéptidos y los de globulina de avena y glutelina de arroz (Vasco Méndez y Paredes López, 1995); y entre la fracción globulina-p y glutelinas de amaranto (Aphalo y col., 2004).

→ Por qué estudiar la potencial capacidad antioxidante de péptidos de amaranto.

La evaluación de la actividad antioxidante de diferentes fuentes naturales está siendo objeto de investigación por los diversos beneficios que se obtienen al incorporar sustancias con capacidad antioxidante en la dieta humana. Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de dietas ricas en alimentos y bebidas de origen vegetal se encontraría asociado a la reducción de la aparición de enfermedades crónico-degenerativas. Tales alimentos son fuentes de sustancias como carotenoides y polifenoles que pueden actuar como agentes antioxidantes, reduciendo los daños causados por especies reactivas de oxígeno formadas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Por otro lado, el uso de ciertos antioxidantes sintéticos en la industria de los alimentos está siendo cuestionado dado que algunos podrían resultar cancerígenos, dirigiéndose las investigaciones a los antioxidantes naturales, principalmente aquellos encontrados en productos vegetales (Singh y col., 2002). Es por ello que el objetivo de numerosas investigaciones se basa en intentar identificar extractos o fracciones de materiales naturales que posean sustancias con actividad antioxidante y que puedan ser incorporadas en la dieta, ya sea constituyendo parte de un alimento, sustituyendo a los antioxidantes artificiales utilizados o actuando en

conjunto con los mismos, reduciendo su concentración (Soares, 2002). Un antioxidante biológico es definido como “cualquier sustancia que presente en bajas concentraciones en relación al sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de este sustrato” (Benzie y Strain, 1996). Así, los antioxidantes actúan como protectores de la oxidación de biomoléculas por radicales libres e impiden la propagación de la reacción oxidativa en cadena provocada por los mismos (Halliweell y Gutteridge, 1998; Fang y col., 2002).

Por otra parte, en los alimentos la oxidación causa variaciones indeseables que pueden llevar tanto a cambios en las características sensoriales como a la reducción del valor nutricional. Por esta razón, los antioxidantes poseen un papel importante en el procesamiento y almacenamiento de los alimentos (Klimczak y Pacholek, 2002).

En la antigüedad, el amaranto ha sido utilizado en ciertas regiones por sus efectos benéficos para la salud sin tener conocimiento científico que avalara dichas propiedades. Es por eso que actualmente se estudian los componentes bioactivos del amaranto. Se han informado diversos beneficios del amaranto sobre la salud humana. En este sentido, se ha descrito la presencia en el grano de amaranto de fitoquímicos que pueden ejercer efectos fisiológicos en humanos, tales como las lectinas, polifenoles, saponinas, inhibidores de tripsina y fitatos, todos ellos excepto los polifenoles no tendrían en principio efectos benéficos sino lo todo contrario (Paredes López, 1994). Se ha demostrado un efecto hipocolesterolémico en dietas a base de semillas o extrudados de amaranto suministrados a animales, siendo esta acción atribuida a la fibra soluble presente en las semillas, y a las proteínas en el caso de los extrudados (Plate y Arêas, 2002). Por otra parte, también se ha demostrado la existencia de péptidos antimicrobianos en algunas especies de amaranto (Lipkin y col., 2005). El grano de amaranto se presenta como un interesante ingrediente en las dietas ‘modernas’ para la preparación de productos especiales. Se han desarrollado alimentos en base a ‘ingredientes naturales’, conteniendo sólo harina de amaranto, que han resultado beneficiosos para aquellas personas con elevado riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y con elevada presión sanguínea (Martirosyan y col., 2007). Además, se ha demostrado que el consumo de aceite de amaranto ha logrado disminuir el colesterol en modelos animales, gracias a su elevado contenido de escualeno y de ácidos grasos insaturados (He y col., 2002); también se ha observado un efecto beneficioso del consumo de aceite sobre las enfermedades coronarias y la hipertensión (Martirosyan y col., 2007). En cuanto a las propiedades antioxidantes, se ha demostrado

actividad relacionada con polifenoles y escualeno (Conforti y col., 2005; Nsimba y col., 2008). Según Martirosyan y col. (2007) se puede considerar al aceite de amaranto como un suplemento antioxidante natural, capaz de proteger a las membranas celulares frente al daño oxidativo.

Se encuentran actualmente en estudio las actividades biológicas de péptidos provenientes de amaranto. Se ha demostrado la actividad antihipertensiva *in vitro* e *in vivo* de hidrolizados proteicos, e identificado algunos péptidos activos (Vecchi y Anón, 2009), así como también la actividad antitumoral (Barrio y Anón, 2009), inmunomoduladora y antitrombótica (Sabbione y col., 2015) de ciertos hidrolizados.

Respecto a la actividad antioxidante, trabajos previamente realizados sugieren una prometedora actividad de componentes peptídicos y polipeptídicos presentes en aislados e hidrolizados proteicos de amaranto (Tironi y Anón, 2010). En este sentido, se detectó actividad antioxidante de componentes de el aislado proteico de *A. mantegazzianus*, así como en las fracciones de albúminas, globulinas y glutelinas, siendo estas últimas las de mayor actividad. Luego de una hidrólisis extensiva con alcalasa, se incrementó la actividad de neutralización de radicales libres del aislado y de todas las fracciones proteicas, incluso la de la globulina-p, la cual presentó la mayor actividad luego de la hidrólisis. El aislado proteico también fue capaz de inhibir la oxidación del ácido linoleico, actividad que fue parcialmente perdida luego de la hidrólisis.

La confirmación de estas y otras propiedades permitirán avanzar en posicionar al amaranto como alimento o ingrediente funcional con beneficios para la salud científicamente comprobados.

Existe actualmente una tendencia mundial hacia el consumo de productos alimenticios que, además de cubrir los requerimientos nutricionales básicos y presentar adecuadas características organolépticas, contribuyan a preservar y mantener la salud y el bienestar general. En este contexto, la ampliación de la base alimentaria con nuevas proteínas funcionales, que posean un alto valor biológico y que además sean fácilmente cultivables y económicamente atractivas en su producción es deseable y necesaria, tanto para el consumidor como para la industria alimentaria. La Ciencia de los Alimentos plantea un importante desafío en el descubrimiento y evaluación de nuevos ingredientes con actividades biológicas, campo en el cual se está realizando una intensa labor de investigación. El cultivo de amaranto posee una buena adaptación a condiciones agroclimáticas adversas, resultando interesante el estudio de sus proteínas, dado el alto valor nutricional que las mismas poseen. Dentro de las actividades biológicas, relevantes en la preservación de la salud, la actividad antioxidante juega un rol primordial dado que los procesos oxidativos se encuentran involucrados en el desarrollo de diversas enfermedades crónicas de alta incidencia en nuestro país.

El **objetivo general** del presente trabajo fue evaluar la actividad antioxidante de proteínas y/o péptidos de amaranto con la finalidad de, en un futuro, adicionar dichas proteínas -en forma de aislado proteico o de aislado previamente hidrolizado- como ingredientes funcionales en la formulación de alimentos.

Dado que la inhibición de los procesos oxidativos cobra importancia tanto a nivel fisiológico, a fin de neutralizar especies reactivas deletéreas presentes en el organismo; como a nivel de los alimentos, evitando su propio deterioro nutricional y organoléptico, así como la formación de productos de oxidación potencialmente tóxicos para el consumidor, la presente tesis plantea abordar estos dos aspectos con los siguientes **objetivos específicos**:

1.- Inhibición de los procesos oxidativos a nivel fisiológico.

- » Optimizar las condiciones de digestión gastrointestinal simulada sobre proteínas de amaranto.
- » Evaluar la potencial actividad antioxidante de aislados e hidrolizados proteicos de amaranto y de sus digeridos gastrointestinales, frente a diversas especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) de importancia fisiológica.
- » Intentar dilucidar el mecanismo de acción antioxidante de las proteínas/péptidos de amaranto.
- » Evaluar la potencial absorción intestinal de ciertos péptidos antioxidantes a través de la utilización de un modelo celular.
- » Identificar péptidos generados por la digestión gastrointestinal de proteínas de amaranto con potencial actividad antioxidante.

2.- Inhibición de los procesos oxidativos en una matriz alimentaria emulsionada.

- » Obtener emulsiones aceite en agua (o/w), utilizando Tween 20 como agente emulsificante, con la adición de preparaciones proteicas de amaranto, a distintas condiciones de pH.
- » Evaluar el efecto de las preparaciones proteicas sobre la estabilidad oxidativa de las emulsiones almacenadas.
- » Analizar parámetros relacionados con la estabilidad física de las emulsiones.
- » Evaluar el posible efecto de la conformación proteica/peptídica sobre los parámetros analizados.

CAPITULO I

*Simulación de la digestión gastrointestinal
de proteínas de amaranto
y caracterización de los digeridos.*

Las proteínas alimentarias son fuente de una gran variedad de péptidos bioactivos, los cuales se encuentran encriptados dentro de estas proteínas y pueden ser liberados durante el procesamiento de los alimentos o *in vivo* durante la digestión gastrointestinal. Dichos péptidos podrían ejercer su acción en el sistema gastrointestinal o, luego de su absorción, sobre diversos órganos o sistemas blanco de nuestro organismo (Satake y col., 2002).

A fin de evaluar la posible liberación de péptidos con diferentes propiedades, en este caso en particular péptidos con actividad antioxidante, es importante realizar estudios *in vitro* simulando la digestión gastrointestinal de las proteínas en estudio. La digestión de los alimentos comienza en la boca, con una disgregación mecánica y química en el caso de algunos componentes alimentarios (no las proteínas), donde los mismos entran en contacto con la saliva durante un tiempo muy corto que varía desde algunos segundos hasta pocos minutos, con un pH que puede estar en el rango de 6,2 - 7,4 (Guyton, 1991; Kedjarune y col., 1997). El proceso digestivo continúa en el estómago, donde el jugo gástrico tiene un pH entre 1,5 y 2 (Charman y col., 1997), aunque luego de la ingesta de alimentos, se produce un aumento temporal del pH entre 3 y 7, por los efectos buffer y de dilución que provocan los componentes alimenticios ingeridos (Dressman y col., 1990; Charman y col., 1997). El tiempo de vaciado del estómago puede variar entre 15 minutos y 3 horas. La fase gástrica es una etapa relevante de la digestión dado que al entrar el alimento en contacto con un pH ácido y con enzimas líticas, se disocian las fibras de colágeno y se desnaturalizan las proteínas presentes, mientras que además se realiza una acción mecánica por las contracciones del estómago. El jugo gástrico es una mezcla de secreciones de varias células epiteliales especializadas, su composición consiste principalmente en agua, ácido clorhídrico, trazas de cloruro de potasio, cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, mucus y enzimas. El mucus es un gel viscoso, que recubre las superficies mucosas del tracto gastrointestinal. Sus características se deben a glicoproteínas denominadas mucinas. Las mucinas son el producto orgánico principal secretado por las células de la superficie epitelial. Los monómeros de mucina son glicoproteínas con una masa molecular de aproximadamente 50 kDa, altamente glicosilados. Además del moco turbio visible, las células superficiales secretan un fluido rico en bicarbonato de sodio, el cual actúa como un medio de protección al bajo pH y a las

condiciones pépticas del lumen gástrico. La principal enzima del jugo gástrico es la pepsina, si bien existen otras enzimas importantes en cantidades mucho menores, tales como la lipasa gástrica, que es la más efectiva para hidrolizar triglicéridos con ácidos grasos de cadena corta, todas ellas derivadas de las células principales o células zimógenas (Johnson, 2002). La pepsina gástrica es en realidad un conjunto heterógeno de proteínas responsables de la actividad proteolítica. Éstas son secretadas en forma de precursores zimógenos inactivos llamados pepsinógenos, el pepsinógeno I (PGI) y el pepsinógeno II (PGII); ambas variantes moleculares se diferencian en carga neta y/o peso molecular y al entrar en contacto con el medio ácido del jugo gástrico se activan. La pepsina es una proteasa aspártica con amplia especificidad, que tiene preferencia de escisión en péptidos con residuos aromáticos o L-aminoácidos dicarboxílicos; corta preferentemente el extremo C-terminal en fenilalanina y leucina (Burrell y col., 1993) y escinde fácilmente uniones entre Leu-Ser, Leu-Thr y Ser-Trp (Schmelzer y col., 2007). Alcanza su mayor actividad a valores de pH entre 2 y 3 y se vuelve inactiva cuando el pH supera el valor de 5. Una de las características esenciales de la digestión proteica con la pepsina es su capacidad para digerir el colágeno, el cual es poco afectado por el resto de las enzimas digestivas. El colágeno es un componente importante del tejido conjuntivo intercelular de las carnes, y es esencial su digestión para que otras enzimas digestivas puedan penetrar en la carne y digerir sus proteínas celulares. La pepsina sólo inicia la digestión de las proteínas y contribuye con un 10 a 20 % del proceso total de conversión de estas macromoléculas en proteosas, peptonas y algunos polipéptidos (Johnson, 2002).

La mayor parte de la digestión proteica tiene lugar en la parte proximal del intestino delgado, es decir, en el duodeno y en el yeyuno, por efecto de las enzimas proteolíticas de la secreción pancreática. El páncreas secreta entre 1500 y 3000 ml diarios de un líquido isoosmótico alcalino ($\text{pH} = 8$) conteniendo alrededor de 20 enzimas y proenzimas, necesarias para la actividad digestiva intestinal. El jugo pancreático se compone principalmente de agua, sales minerales y varias proteínas, entre las que se incluyen mucinas y las diversas enzimas y proenzimas. Entre los principales componentes inorgánicos se encuentran el sodio, potasio, cloruro, calcio, zinc, fósforo y sulfato. Desde el punto de vista fisiológico, el bicarbonato es el ion de mayor importancia segregado por el páncreas, cuya función es neutralizar el quimo ácido proveniente del estómago y proveer el pH adecuado para el funcionamiento de las enzimas pancreáticas (Johnson, 2002).

El páncreas también segrega enzimas amilolíticas, lipolíticas y proteolíticas. Las enzimas amilolíticas, como la amilasa, hidrolizan el almidón produciendo oligosacáridos y maltosa. Las enzimas lipolíticas comprenden la lipasa, fosfolipasa A y la colesterol esterasa. En el duodeno, los lípidos son emulsionados por las sales biliares provenientes del hígado a fin de poder ser atacados por las enzimas. Para ello, la lipasa requiere de la unión a la colipasa que es otro constituyente del jugo pancreático, favoreciendo su unión a las gotitas emulsionadas. También secreta ribonucleasas y desoxirribonucleasas, que degradan a los ácidos nucleicos para formar nucleótidos libres. Las enzimas proteolíticas son secretadas como proenzimas inactivas. La enteropeptidasa, una enzima que se encuentra en la mucosa duodenal, rompe un enlace lisina-isoleucina del tripsinógeno para formar tripsina, la cual a su vez continúa activando tripsinógeno para que produzca más tripsina, y también transforma el quimotripsinógeno y las pro-carboxipeptidasas A y B en sus enzimas activas. Dentro de estas enzimas proteolíticas, algunas son endopeptidasas, como la tripsina y la quimotripsina, que hidrolizan las moléculas proteicas en pequeños polipéptidos, actuando sobre los enlaces peptídicos; mientras que otras son exopeptidasas que actúan sobre los extremos terminales libres de las proteínas. Las carboxipeptidasas actúan sobre los extremos carboxilo terminal de las proteínas y polipéptidos. La proelastasa da origen a la elastasa que digiere las fibras de elastina que mantienen la arquitectura de las carnes y de otras matrices. Las enzimas pancreáticas sólo degradan un pequeño porcentaje de las proteínas hasta sus aminoácidos constituyentes. La mayoría permanecen en forma de dipéptidos y tripéptidos o incluso moléculas algo mayores (Adler, 1997).

El pH intestinal va variando desde 4,5 en el duodeno hasta 7,5 en el ileón (Daugherty y Mrsny, 1999). Por lo general, el quimo alimenticio permanece entre 30 y 45 minutos en el duodeno con un pH que varía entre 4 y 5,5; luego en el yeyuno puede permanecer entre 90 y 120 minutos, con una variación del pH entre 5,5 y 7; y, por último, en el ileón el tiempo de permanencia puede variar entre 5 y 7 horas, con una variación del pH entre 7 y 7,5 (Vermeirssen y col., 2003). Dicho tiempo variará de acuerdo a las cantidades relativas de alimento, agua y secreciones intestinales y al grado de digestión que haya ocurrido hasta el momento.

El paso final de la digestión de las proteínas ocurre en la luz intestinal y está encomendado a los enterocitos que revisten las vellosidades del intestino delgado, sobre todo en el duodeno y el yeyuno. Estas células tienen un borde en cepillo formado por miles de microvellosidades que se proyectan desde la superficie de cada célula. La membrana

celular de cada una de estas microvellosidades contiene múltiples peptidasas que sobresalen de la membrana y entran en contacto con los líquidos intestinales. Existen dos tipos de peptidasas de especial importancia, las aminopolipeptidasas y varias dipeptidasas, las cuales continúan la degradación de los polipéptidos resultantes a tripéptidos o dipéptidos y algunas incluso liberan los aminoácidos. Tanto los aminoácidos como los dipéptidos y los tripéptidos se transportan fácilmente a través de la membrana de la microvellosidad hacia el interior del enterocito.

Por último, en el citosol de los enterocitos, existen otras muchas peptidasas específicas. En pocos minutos se completa la digestión de los dipéptidos y tripéptidos hasta el estado final de aminoácidos simples (Pappenheimer y col., 1994).

Un alto porcentaje de los productos finales de la digestión de proteínas absorbidas son aminoácidos, la absorción de péptidos ocurre en baja proporción y la de moléculas proteicas completas es aún mucho menor, aunque en el caso de lograr ser absorbidas podrían provocar serios disturbios inmunológicos o alergias. Sin embargo, se ha observado que es posible la absorción de péptidos de cadenas cortas en porcentajes bajos, en muchos casos incluso menor al 1% (Regazzo y col., 2010; Vermeirssen y col., 2004)

En el presente Capítulo, nos centraremos en la simulación de la digestión de las proteínas de amaranto tanto en el estómago como en la parte proximal del intestino delgado, mientras que el proceso de absorción de péptidos por los enterocitos será analizado en un capítulo posterior, el Capítulo III.

Existen muchos protocolos diferentes para estudiar la digestión gastrointestinal *in vitro*, los cuales van a diferir en el número y tipo de pasos involucrados en la digestión (boca, estómago, intestino delgado, intestino grueso); la composición de fluidos digestivos utilizados en cada paso (enzimas, sales, buffers, polímeros biológicos); y los esfuerzos mecánicos y el flujo de fluidos utilizado en cada paso de la digestión (magnitud y dirección de las fuerzas mecánicas, perfiles de flujo y geometría de flujo) (Hur y col., 2011). También existen diferencias entre los parámetros experimentales medidos luego o durante la digestión, lo cual puede incluir cambios químicos (hidrólisis de lípidos, proteínas o polisacáridos, por ejemplo), cambios de locación (liberación de compuestos encapsulados, procesos de adsorción competitiva) o cambios estructurales (rotura de uniones específicas, agregación, coalescencia). Las enzimas y otras moléculas biológicas

utilizadas en la mayoría de estos ensayos son la pepsina, pancreatina, tripsina, quimotripsina, peptidasa, α -amilasa, lipasa, sales biliares y mucina. Distintos factores como la concentración de las enzimas, la relación enzima/sustrato, la temperatura, el pH, la estabilidad, la presencia de inhibidores y los tiempos de incubación van a afectar la actividad enzimática (Boisen y Eggum, 1991).

Abdel-Aal (2008) afirma que la elección de las enzimas proteolíticas, de las condiciones de digestión y de los métodos para analizar los hidrolizados proteicos tiene un efecto muy importante sobre la digestibilidad proteica y va a depender principalmente del objetivo de estudio (Boisen y Eggum, 1991). Hur y col. (2011) demostraron que aquellos métodos de digestión *in vitro* que utilizan complejos enzimáticos tienen la ventaja de ser más reproducibles que aquellos que utilizan enzimas simples. Por otra parte, Abdel-Aal (2008) informó que las diferencias en la digestibilidad también van a depender de la fuente proteica (vegetal/animal, cruda/procesada) y que un aumento en la cantidad de proteína dietaria provocaría un aumento en la secreción de enzimas proteolíticas pancreáticas, por lo que las características de la digestión gastrointestinal *in vitro*, tales como el tiempo de digestión, el contenido y la composición enzimática, deben ser ajustados de acuerdo a las características de las muestras en estudio.

Si bien las correlaciones entre los estudios *in vitro* y lo que ocurre realmente *in vivo* son extremadamente importantes (Fatouros y Mullertz, 2008), son pocos los estudios que han evaluado dicha correlación en muestras de origen alimentario y, en especial, sobre las proteínas dietarias. A pesar de que el mecanismo de digestión en el organismo humano se encuentra ampliamente estudiado, resulta muy difícil reproducir las condiciones frente a las que se enfrenta un alimento cuando ingresa en nuestro organismo, lo cual se debe a la gran cantidad y variedad de enzimas y electrolitos, a las variaciones de pH y de concentración de otras especies, como así también a todos los sistemas de regulación que posee el organismo y a los movimientos estomacales e intestinales intrínsecos.

OBJETIVO GENERAL.

Analizar distintas condiciones de simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* de proteínas de amaranto y caracterizar las muestras obtenidas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- » Evaluar diferentes condiciones de digestión gastrointestinal simulada sobre un aislado proteico de amaranto, variando relaciones enzimas/sustrato y tiempos de reacción.
- » Analizar, junto con el grado de hidrólisis, la potencial actividad antioxidante de los digeridos obtenidos y seleccionar las condiciones óptimas de digestión.
- » Aplicar las condiciones seleccionadas sobre un hidrolizado proteico de amaranto obtenido por acción de la alcalasa.
- » Analizar la composición molecular de los digeridos.

I. 1.- Obtención de aislado e hidrolizado proteico de *Amaranthus mantegazzianus*.

I. 1. a.- Aislado (Ais)

Se utilizaron semillas de *Amaranthus mantegazzianus* obtenidas a partir de cultivos realizados en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa, Argentina. La harina correspondiente se obtuvo luego de moler las semillas en un molino Udy utilizando una malla de 1 mm y tamizar a través de un cedazo de 0,092 mm de malla. Luego, se procedió a desgrasar la harina por extracción con n-hexano, para lo cual una suspensión de 10 g de harina/100 ml de n-hexano se mantuvo en agitación durante 5 horas a temperatura ambiente, luego se dejó reposar durante 24 horas y a continuación se separó la harina desgrasada por filtración, permitiendo la eliminación de restos de solvente a temperatura ambiente.

Para obtener los aislados proteicos se preparó una suspensión de la harina en agua bidestilada (10 g/100 ml), la cual se llevó a pH = 9 con NaOH 2 N, se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se centrifugó a 9000 x g durante 20 minutos a 4 °C. A continuación, se ajustó el pH del sobrenadante a 5 con HCl 2 N, con el objetivo de lograr la precipitación isoelectrica de las proteínas, luego se volvió a centrifugar durante 20 minutos a 9000 x g a 4 °C. Los precipitados obtenidos fueron resuspendidos en agua bidestilada, llevados a pH neutro con NaOH 0,1 N, congelados a -80 °C y, por último, liofilizados (liofilizador Heto FD4 con bomba de vacío Vacuubrand RZ5) (Martinez y Añón, 1996). Los liofilizados se molieron con mortero y se mantuvieron a 4 °C en frasco hermético hasta su utilización.

I. 1. b.- Hidrolizado proteico con alcalasa (Halc)

Se preparó una suspensión de 1 g de aislado/100 ml de NaOH 1 mM (pH = 10), la cual se mantuvo en agitación durante 1 hora a 37 °C, manteniendo el pH constante por agregado de NaOH 0,1 M. Luego, se adicionó alcalasa ($\geq 2,4$ U/g, Anson Units, Sigma) en una relación de 8 μ l/100 mg de muestra, incubando la mezcla durante 4 horas a 37 °C, con el objetivo de obtener un elevado grado de hidrólisis (Tironi y Añón, 2010). Finalmente, se detuvo la reacción enzimática por calentamiento a 85 °C durante 10 minutos, congelando las

suspensiones a -80 °C, para luego liofilizarlas. Los liofilizados se molieron con mortero y se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización.

I. 2. - Simulación de la digestión gastrointestinal.

El aislado proteico de *Amaranthus mantegazzianus* fue sometido a una digestión gastrointestinal simulada teniendo en cuenta ensayos encontrados en la literatura (Roesler y Rao, 2001; Hernández-Ledesma y col., 2004), los cuales fueron adaptados y optimizados para el presente trabajo. En primer término, el aislado proteico se sometió a una hidrólisis con una solución de pepsina (Pepsina 1:15000 MP Biomedicals, Inc.) (Pe) en HCl 0,1 N y NaCl 0,03 M (pH = 2, 37 °C); seguida, luego de una neutralización a pH = 6 con NaOH, de la acción de una solución de pancreatina (Pancreatina Porcina 4X-USP MP Biomedicals, Inc.) (Pa) en NaHCO₃ 0,1 N (pH = 6, 37 °C). Por último, se detuvo la actividad enzimática por calentamiento a 85 °C durante 10 minutos.

A fin de optimizar las condiciones de digestión, se ensayaron diferentes relaciones Pepsina/Proteína (1/20 y 1/10 p/p) y Pancreatina/Proteína (1/100 y 1/10 p/p), y diferentes tiempos de reacción: 60 y 90 minutos para la pepsina y 30, 60 y 120 minutos para la pancreatina. En todos los casos se analizaron, junto con las respectivas muestras, sistemas control sometidos a similares condiciones de pH, tiempo/temperatura pero sin el agregado de las enzimas.

Luego del procesamiento, las muestras fueron congeladas a -80 °C y liofilizadas.

I. 3.- Caracterización de las muestras.

I. 3. a.- Determinación de hidratos de carbono: Método de Fehling-Causse-Bonnans (FCB).

Para determinar el contenido de glúcidos totales, se utilizó un método directo por hidrólisis ácida y valoración de los azúcares reductores liberados. Para ello, se calentó la muestra con agua y ácido clorhídrico 1 M en un balón con refrigerante a reflujo, durante 2 horas. Se enfrió, se neutralizó con NaOH, se llevó a volumen, se filtró y se valoró la cantidad de glucosa liberada por el método de FCB.

Se preparó la solución de FCB (13 % p/v de tartrato de sodio y potasio, 11 % p/v de hidróxido de sodio, 2,4 % p/v de sulfato de cobre y 1,68 % p/v de ferrocianuro de potasio).

Para la determinación, se titularon 10 ml de reactivo FCB en ebullición agregando la muestra desde bureta a una velocidad de goteo controlada y utilizando azul de bromofenol para visualizar el punto final. Se utilizó una solución 0,5 % p/v de glucosa como patrón (AOAC 1965).

I. 3. b.- Determinación de proteínas: Método de microKjeldahl

Para determinar el contenido proteico total de los liofilizados se utilizó el método de microKjeldahl (Nkonge y Balance, 1982). Para ello, se tomaron muestras de los liofilizados de manera tal que contuvieran aproximadamente 5 mg de proteínas, se colocaron en balones con 1 g de catalizador ($\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{CaSO}_4$ 10/1 p/p) y 3 ml de H_2SO_4 concentrado (98 % p/p), y se digirieron por calentamiento hasta que la mezcla adquirió un color verde translúcido. La solución resultante se llevó a un volumen final de 25 ml con agua bidestilada para luego realizar la reacción colorimétrica. Paralelamente se realizó la digestión de 4 muestras de albúmina de suero bovino (Sigma) conteniendo entre 0 y 6 μg de nitrógeno/100 μl de solución.

El amoníaco producido fue determinado directamente en el digerido por el desarrollo de una coloración azul verdosa debida a la formación de un complejo fenol-indofenol por reacción con soluciones de fenol alcalino, hipoclorito y nitroprusiato de sodio. Para la reacción colorimétrica se tomaron 250 μl de las muestras y se mezclaron con 750 μl de solución A+B (50:50) (A: Na_2HPO_4 0,2 M, NaOH 0,2 M y tartrato de Na y K 0,36 M; B: NaOH 2,5 M), 200 μl de solución N-S (Nitroprusiato-Salicilato) y 100 μl de hipoclorito de sodio con 5,5 % de cloro activo. Se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego se tomaron 350 μl de dicha mezcla de reacción a los que se adicionaron 975 μl de agua bidestilada y se les midió la absorbancia a 660 nm.

Para calcular el contenido de proteínas se utilizó un factor de Kjeldhal $f = 5,85$ mg de proteína/mg de N (Becker y col, 1981).

I. 3. c.- Determinación de agua: Método indirecto

Una masa exactamente pesada de muestra fue colocada en una estufa a 103 ± 2 °C secándose hasta peso constante.

I. 3. d.- Determinación de cenizas totales: Incineración en mufla

Las cenizas son los residuos que quedan luego de la incineración completa de los componentes orgánicos de un alimento, en condiciones determinadas. Para la determinación, se colocó una cantidad exactamente pesada de muestra y se calentó en mechero hasta residuo carbonoso, luego se colocó en la mufla a 550°C hasta cenizas blancas y peso constante.

I. 3. e.- Determinación de lípidos: Método de Soxhlet

Para determinar el contenido de materia grasa en las muestras se realizó una extracción semi-continua de los lípidos con éter de petróleo, determinando gravimétricamente el extracto lipídico. Se utilizó un dispositivo de extracción Soxhlet como el que se puede observar en la *Figura I. 1*.

Se colocó una masa exactamente pesada de muestra liofilizada en un cartucho de extracción libre de grasa, el cual se ubicó en el tubo extractor. Por la parte superior del mismo se agregó el solvente en una cantidad que excedía la necesaria para un sifonado. Se llevaron a cabo 7 ciclos de llenado y sifonado del tubo extractor a fin de asegurar la extracción completa de los lípidos. La masa de lípidos extraída en el balón fue determinada por pesada luego de la eliminación total del solvente.

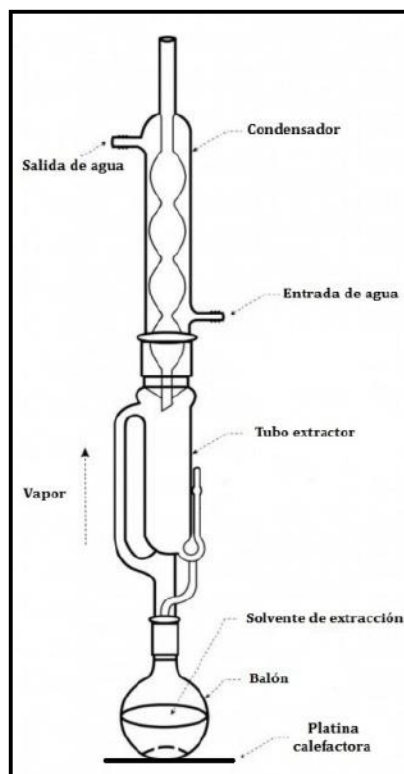


Figura I. 1.- Diagrama esquemático del equipo Soxhlet.

I. 4.- Determinación del grado de hidrólisis.

El grado de hidrólisis fue determinado mediante el análisis de la concentración de grupos aminos libres por el método del ácido 2,4,6-trinitrobenceno-sulfónico (TNBS) (Adler – Nissen, 1979). Se prepararon dispersiones conteniendo 1 mg de proteína/ml en buffer fosfato 0,2125 M con 1 % de SDS (dodecil sulfato de sodio, Anedra), pH = 8,2, las cuales se incubaron en un baño a 75 °C durante 15 minutos. Una alícuota de dichas dispersiones (63 µl) fue tratada con buffer fosfato 0,2125 M, pH = 8,2 y solución de TNBS 0,05 % p/v. Luego de incubar durante 1 hora a 50 °C al resguardo de la luz, se detuvo la reacción con HCl 0,1 N y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de la absorbancia a 340 nm con un espectrofotómetro Beckman DU 650. Se utilizó L-Leucina (ácido L-2-amino-4-metil-pentanoico, Sigma) como patrón para la construcción de la curva de calibración, en concentraciones entre 0,225 y 2,25 mM. Todas las medidas se realizaron por duplicado. El grado de hidrólisis (GH) se calculó a través de la *Ecuación I. 1*.

$$\text{GH} = \frac{[-\text{NH}_2]_h - [-\text{NH}_2]_0}{[-\text{NH}_2]_\infty - [-\text{NH}_2]_0} \times 100 \quad [\text{Ec. I. 1}]$$

donde $[-\text{NH}_2]$ indica la concentración de grupos amino libres en la muestra sin hidrolizar ($_0$), en la muestra hidrolizada ($_h$) y en la muestra hidrolizada completamente ($_\infty$). El valor de $[-\text{NH}_2]_\infty$ fue estimado a través de la *Ecuación I. 2*.

$$[-\text{NH}_2]_\infty = \frac{1}{M_{aa}} \times (1 + f_{lys}) \times C_{prot} \quad [\text{Ec. I. 2}]$$

donde M_{aa} es el promedio de pesos moleculares de los aminoácidos en las proteínas de amaranto (130 g/mol), f_{lys} es la proporción de lisina en estas proteínas (1/15) (Bressani, 1994), y C_{prot} es la concentración de proteínas en la muestra.

I. 5.- Obtención de fracciones solubles.

Se prepararon dispersiones de las muestras liofilizadas (10 mg/ml) en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) agitando a 37 °C y 300 rpm durante distintos períodos de tiempo (10, 30, 60 y 120 minutos) en un equipo Termomixer Eppendorf, a fin de seleccionar las condiciones óptimas de solubilización de las proteínas. Luego, se centrifugaron las muestras a

temperatura ambiente durante 10 minutos a 10400 x g en una microcentrífuga a temperatura ambiente (Spectrafuge 24D, LabNet International) y, por último, se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante.

I. 6.- Determinación de la concentración de proteínas solubles.

La determinación de la concentración proteica en las fracciones solubles se realizó mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Para ello, se realizó una dilución 1/25 de las fracciones solubles en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8). Las muestras se mezclaron con 1 ml de la solución A+B (A: Na_2CO_3 2 % p/v - NaOH 0,1 N; y B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 % p/v, tartrato de Na y K 2 % p/v), se agitaron vigorosamente con un vórtex y se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, momento en el cual se les agregó 100 μl de la solución de Folin (dilución 50 % v/v en agua bidestilada) (Folin Ciocalteau, Anedra), se agitaron enérgicamente y se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650. Y en paralelo se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (Sigma) (0 - 0,4 mg/ml).

I. 7.- Electroforesis.

Fundamento.

La electroforesis es un método analítico o semipreparativo, que utiliza una corriente eléctrica controlada con el fin de separar biomoléculas de acuerdo a su tamaño, carga eléctrica y estructura tridimensional. Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta es colocada en un campo eléctrico, éstas experimentarán una fuerza de atracción hacia el polo que posee la carga opuesta. En el caso en el que se quieran separar proteínas, generalmente se adiciona SDS que les incorpora una carga negativa a todas las moléculas proteicas de manera de separarlas únicamente de acuerdo a la masa y estructura tridimensional de las mismas.

Como soporte generalmente se utiliza poliacrilamida, que es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparada de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante un tiempo

prolongado. Presenta la ventaja de que variando su concentración, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro. Para formar el gel de poliacrilamida, se produce una polimerización del monómero acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ y del monómero entrecruzador N, N'-metilen-bis-acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por acción de radicales libres de oxígeno. Las aminas terciarias como el N, N, N, N'-tetrametilendiamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato también utilizado en esta técnica.

Hay muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son el pH, la fuerza iónica, el gradiente de potencial, el tiempo de corrida, las concentraciones de acrilamida y bisacrilamida, etc. La concentración de acrilamida representa el porcentaje en peso del monómero total empleado (acrilamida + entrecruzador en gramos por 100 ml) y determina la longitud promedio de la cadena del polímero. La concentración de bisacrilamida representa el porcentaje de este monómero en el gel y determina el grado de entrecruzamiento.

La utilización de geles con tricina es muy adecuada para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kDa y tiene la particularidad de usar dos buffers distintos. Un buffer catódico conteniendo tricina y un buffer anódico de Tris-HCl. La tricina es utilizada como ión de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores concentraciones de acrilamida que en el caso del clásico buffer Tris-glicina (Schägger y von Jagow, 1987). Con un sistema de tres geles de diferente concentración: un gel de apilamiento (stacking), un gel espaciador (spacer) y un gel separador se logra una buena resolución de polipéptidos, sobre todo en el rango de 5 a 20 kDa.

Procedimiento experimental.

Se llevaron a cabo corridas de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) utilizando geles de tricina (Schägger y von Jagow, 1987).

→ Reactivos utilizados:

- Buffer anódico: Tris 0,1 M (pH = 8,9) (Trizma base (Sigma)).
- Buffer catódico: Tris 0,1 M, tricina 0,1 M (Sigma), SDS 0,1 % p/v (pH = 8,25).
- Buffer gel: Tris 1 M, SDS 0,1 % p/v (pH = 8,45).

- Buffer de muestra: Tris-HCl 37,5 mM (pH = 7), glicerol 7,5 % p/v (Anedra), SDS 3 % p/v, Coomasie blue G 250 (Serva) 0,0125 % p/v.
- Soluciones de acrilamida-bisacrilamida: AB.3: Acrilamida 24 % p/v, bisacrilamida 0,75 % p/v (relación bis/acril: 3 %); AB.6: acrilamida 24 % p/v, bisacrilamida 1,5 % p/v (relación bis/acril: 6 %).
- N', N', N', N', tetrametiletilendiamina (TEMED): concentración final: 0,01 % v/v.
- Persulfato de amonio 10 % p/v.
- Fijador: metanol 50 % v/v, ácido acético 10 % v/v.
- Colorante: Coomasie blue R-250 0,1% p/v en metanol 30 % v/v/ ácido acético 10 % v/v.
- Solución decolorante: metanol 30 % v/v / ácido acético 10 % v/v.

→ Preparación de los geles:

- Gel separador 16 %: 0,65 g de glicerol, 3,3 ml de acrilamida stock AB.6, 1,7 ml de buffer gel 3X, 17,5 µl de persulfato 10 % p/v y 1,6 µl de TEMED.
- Gel spacer 10 %: 1,01 ml de acrilamida stock AB.3, 0,84 ml de buffer gel 3X, 0,65 ml de agua bidestilada, 8,5 µl persulfato 10 % p/v y 0,83 µl de TEMED.
- Gel de stacking 4 %: 0,32 ml de acrilamida stock AB.3, 0,5 ml de buffer gel 3X, 1,18 ml de agua bidestilada, 16 µl de persulfato 10 % p/v y 2 µl de TEMED.

Se colocaron 4,35 ml del gel separador entre las placas (con una fina capa de agua destilada por encima para favorecer la polimerización) y se dejó gelificar a 37 °C. Luego se agregaron 450 µl del gel spacer y se repitió el procedimiento. Por último, se colocó el peine y el gel de stacking, dejando gelificar a 37 °C. Todas las electroforesis se realizaron en miniplacas con un equipo Mini Protean II (BIO-RAD).

→ Preparación de las muestras:

Muestras liofilizadas: se pesaron 2,7 mg de las muestras liofilizadas y se resuspendieron en 1 ml de buffer muestra 1X, sembrándose 10 µl por calle (20 µg de proteína).

Muestras solubles: se realizó una dilución ½ en buffer muestra 2X y de cada una se sembró una cantidad tal que contuviera 20 µg de proteína.

→ Corrida:

Se realizó la corrida a 30 V, 30 mA durante el pasaje a través del gel de stacking, aumentando a 90 V en el gel separador.

→ Fijación y coloración con Coomassie blue:

Finalizada la corrida, se procedió a fijar las proteínas con la solución fijadora durante 30 minutos, luego se realizó la coloración cubriendo el gel con la solución de Coomassie Blue R-250 manteniendo en agitación durante toda la noche. Por último se procedió a decolorar sucesivas veces, hasta observar las bandas con claridad, lavando finalmente con agua bidestilada.

I. 8.- Cromatografía de exclusión molecular FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Fundamento.

En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria se encuentra constituida por partículas poliméricas de diferente porosidad. El principio básico de separación está relacionado con el tamaño de las partículas. Las proteínas más grandes no podrán ingresar en los poros de la matriz de filtración y, por lo tanto, serán eluidas con más rapidez que aquellas proteínas pequeñas que van penetrando en los distintos poros de las partículas y siguen un camino más tortuoso y largo, como se observa en la *Figura I. 2*. El tamaño de los poros internos generados dependerá de la naturaleza del polímero que forme la fase estacionaria y permitirá la separación de proteínas por debajo de una determinada masa molecular.

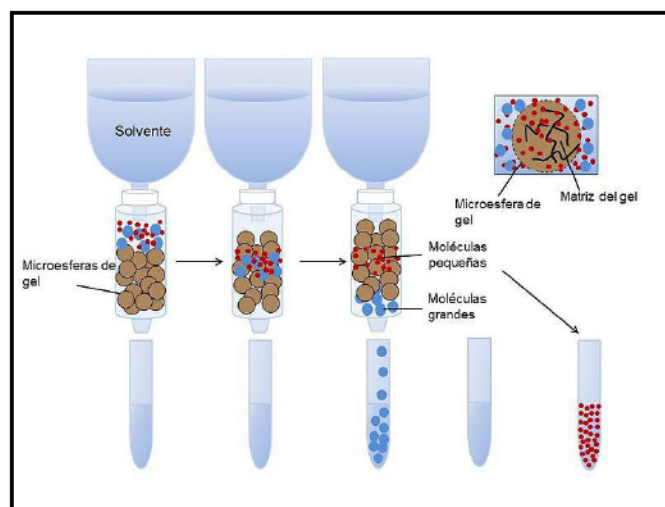


Figura I.2.- Modelo de separación por FPLC.

Procedimiento experimental.

Se analizaron las fracciones solubles de las muestras en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8). Las corridas fueron realizadas en un equipo de FPLC (Pharmacia LKB, FPLC System, Uppsala, Suecia) utilizando dos columnas de filtración en gel diferentes, ambas compuestas por una matriz de dextrano unido covalentemente con agarosa altamente sustituida. Dichas matrices combinan las excelentes propiedades de filtración en gel del dextrano con la estabilidad física y química de la agarosa con un elevado número de sustituciones. Una de las columnas utilizadas fue la Superdex 30, que presenta un rango de separación óptimo por debajo de los 10 kDa, siendo el volumen total (V_t) de la columna de 28 ml. La otra columna que se utilizó fue la Superdex 75 10/30GL (GE Healthcare) con un límite de exclusión de 100 kDa, un rango de separación de entre 3 y 70 kDa y un V_t de 24 ml.

El volumen de inyección fue de 200 μ l de muestra para ambas columnas, las eluciones se realizaron con buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) con un flujo de 0,4 ml/min. Los polipéptidos y péptidos fueron detectados midiendo la absorbancia a 280 nm.

I. 9.- Cromatografía Líquida de Alta Presión en fase reversa (RP-HPLC).

Fundamento.

La cromatografía RP-HPLC, en la cual la fase móvil es de polaridad moderada y la estacionaria es apolar, es la más utilizada para separar muestras de polímeros o proteínas. Este tipo de cromatografía se basa en el principio de separación de acuerdo a las interacciones que resultan entre el disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por el aumento de la entropía y la consecuente disminución de la energía libre, asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil, modificando el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye. En la separación también influye la masa molecular de los analitos que se separan. Las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de

retención (t_R) aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto.

Procedimiento experimental.

Las fracciones solubles en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) de las distintas muestras fueron analizadas mediante el uso de una columna preparativa SunFire prep C8 ST 10/250, con partículas de 5 μ m de diámetro (Waters) en un sistema de HPLC Waters (Waters Corp, Milford, USA) equipado con un detector de arreglo de diodo (DAD). Se realizó una elución en gradiente utilizando dos solventes: el solvente A constituido por una mezcla acetonitrilo: agua (2:98) con 650 μ l/l de ácido trifluoroacético (TFA), mientras que el solvente B estaba compuesto por una mezcla de acetonitrilo: agua (65:35) con 650 μ l/l de TFA. Las muestras fueron eluidas a un flujo de 5,2 ml/minuto con un gradiente lineal del solvente B en A (0 a 100 % de B en 55 minutos). La presión durante la corrida fue de aproximadamente 1800 psi. La corrida se llevó a cabo a 40 °C y la detección se realizó a 210 y 280 nm.

I. 10.- Evaluación de la actividad antioxidante.

I. 10. a.- Secuestro del catión radical ABTS^{•+}.

ABTS : ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico

Fundamento.

El método del ABTS es un ensayo de decoloración para determinar la capacidad antioxidante, aplicable tanto para antioxidantes de carácter hidrofílico como hidrofóbico. El radical preformado ABTS^{•+} es generado por la oxidación del ABTS con persulfato de potasio (Re y col., 1999). En la *Figura I. 3* se presentan los espectros de absorción del ABTS^{•+} formado luego de distintos tiempos de reacción (entre 12 y 16 horas). El mismo presenta tres máximos de absorción: 645 nm, 734 nm y 815 nm (Re y col., 1999), observándose que si bien a todos los tiempos el perfil es similar, a las 16 horas se alcanza la máxima absorbancia. El presente método utiliza el máximo de 734 nm para realizar las medidas de absorbancia.

Se ha reportado que las sustancias antioxidantes podrían neutralizar al ABTS^{•+} a través de un mecanismo de donación de un átomo de hidrógeno (HAT), así como también a través de

la transferencia de un electrón (SET) (Nenadis y col., 2003). La adición de antioxidantes a este catión radical cromóforo reduce la absorbancia en una medida dependiente de la capacidad antioxidante de la muestra, la concentración de la misma y el tiempo de exposición. Por lo tanto, la extensión de la decoloración, como indicativo del porcentaje de inhibición, es función de la concentración y del tiempo y suele calcularse en relación a la reactividad del Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) o del BHT utilizados como estándares, bajo las mismas condiciones de ensayo.

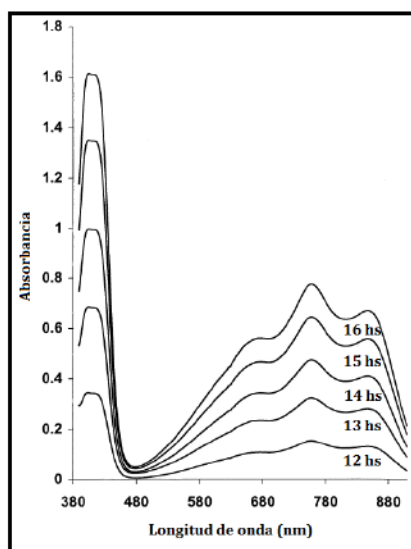


Figura 1. 3.- Espectro de absorción del catión radical ABTS⁺. (Re y col., 1999).

Procedimiento experimental.

El método de decoloración del catión radical ABTS⁺ se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita en trabajos previos (Re y col., 1999; Siddhuraju, 2006) con algunas modificaciones. En primera instancia, se obtuvo el radical ABTS⁺ por reacción de una solución 7 mM de ABTS (Fluka) con persulfato de potasio (Anedra) (concentración final: 2,45 mM) incubados a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 12-16 horas. Previo al ensayo, la solución de ABTS⁺ fue diluida con agua bidestilada hasta obtener una absorbancia a 734 nm de $0,70 \pm 0,02$ en una cubeta de 1 cm medida en un espectrofotómetro HeλIOS β (Thermo Electron Corporation).

A fin de evaluar la potencial acción antioxidante de las distintas muestras, se prepararon mezclas de 1000 µl de la solución diluida de ABTS⁺ con 10 µl de distintas diluciones (1:10, 1:5, 1:2,5 y sin diluir) de las fracciones solubles en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) y se midió la absorbancia a 734 nm a distintos tiempos (0 - 10 minutos), utilizando Trolox

(análogo hidrosoluble de la vitamina E) (Fluka) (0,5 – 1,5 mM) como control con actividad antioxidante conocida. Con las medidas efectuadas para cada dilución de las muestras y del blanco (buffer fosfato 35 mM, pH = 7,8) se calculó el % de inhibición del radical a través de la *Ecuación I. 3*.

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{(\text{Abs } B_{0\text{min}} - \text{Abs } M_{10\text{min}}) - (\text{Abs } B_{0\text{min}} - \text{Abs } B_{10\text{min}})}{\text{Abs } B_{0\text{min}}} \times 100$$

[Ec. I.3.]

Donde: AbsB_{0min} y AbsB_{10min} se refieren a la absorbancia del blanco a los 0 y 10 minutos respectivamente, y AbsM_{10min} se refiere a la absorbancia de la muestra a dicho tiempo.

Cada medida fue realizada por triplicado y se graficó el % de inhibición respecto a la concentración de proteína, con el objetivo de calcular la concentración de proteína que es capaz de provocar el 50 % de inhibición (IC₅₀) para cada muestra.

I. 10. b.- Método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

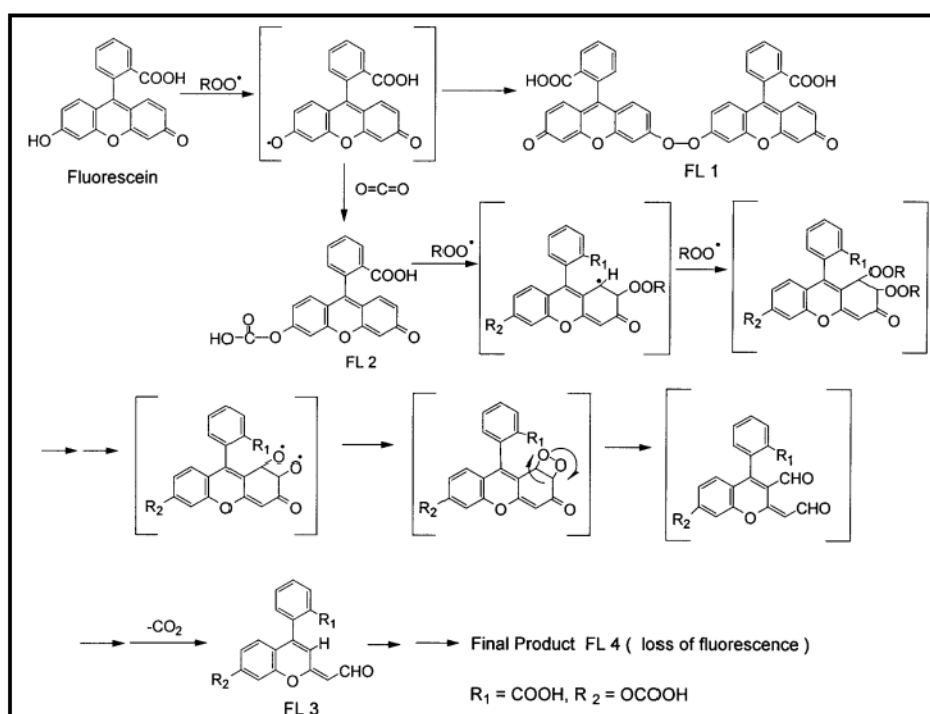
Fundamento.

Inicialmente, el método ORAC fue desarrollado por Cao y col. (1998), siendo posteriormente adaptado y mejorado por diferentes autores tales como Ou y col. (2001) y Kim y col. (2007), entre otros. A través del método ORAC es posible medir la capacidad “secuestrante” de radicales libres al exponer la muestra a un generador de radicales peroxilos (2,2'-azobis-(2-metilpropionamida) dihidrocloruro, AAPH) a 37 °C, utilizando la fluoresceína (3',6'-dihidroxiespiro [2-benzofuran-3,9'-xanten]-1-ona) como sonda fluorescente. Lo que se determina es la degradación oxidativa de la fluoresceína, que al reaccionar con los radicales generados por el AAPH se descompone formando, posiblemente, alguna de las diversas estructuras que se muestran en la *Figura I. 4*, con la consiguiente pérdida de fluorescencia (Ou y col., 2001).

El primer paso en la oxidación de la fluoresceína es la pérdida de un hidrógeno del grupo fenol que es “secuestrado” por un radical peroxilo, formando el compuesto radical fenoxil fluoresceína (FLO•) que puede dimerizarse rápidamente formando FL1 o atacar cantidades

traza de CO₂ en el buffer para formar FL2. Luego de la abstracción de un hidrógeno, el radical peroxilo ROO• puede adicionarse a un doble enlace conjugado C-C para formar un radical deslocalizado que reaccionará con ROO• para formar el intermediario endoperoxido, seguido de ciertos pasos de descomposición hasta formar FL3, el cual sigue oxidándose hasta formar FL4 que no posee emisión de fluorescencia a 495/515 nm.

A través de este estudio de la vía de oxidación de la fluoresceína (Ou y col., 2001), pudo demostrarse que el mecanismo oxidativo del ensayo ORAC corresponde a un mecanismo HAT. Este método mide directamente la actividad antioxidante de compuestos que actúan interrumpiendo la cadena de reacciones de radicales peroxilo (antioxidantes “chain breaking”) durante la etapa de propagación del proceso de oxidación.



*Figura I. 4.- Posibles vías de oxidación de la fluoresceína en presencia del AAPH
(Ou y col., 2001)*

La pérdida de fluorescencia es, por lo tanto, un indicativo del daño que está sufriendo la fluoresceína por su reacción con radicales peroxilo. Aquellos compuestos con capacidad antioxidante protegerán a dicha molécula de la degradación oxidativa, inhibiendo o disminuyendo la pérdida de fluorescencia. El efecto protector de los antioxidantes es

medido al calcular el área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia de la muestra comparada con el control negativo (CN) en el cual no hay antioxidantes presentes.

El método ORAC es el único método que permite evaluar tanto el tiempo de inhibición como el grado de inhibición a medida que la reacción avanza. Con la determinación del área bajo la curva (AUC) se toman en consideración ambos parámetros, lo cual no es posible a través de otros ensayos (Huang y col., 2002).

Procedimiento experimental.

Este método fue llevado a cabo a partir del descrito por Kim y col. (2007) con una leve modificación. Para ello, se preparó una solución stock 53,3 μM de fluoresceína (Anedra) en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) y se mantuvo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad. En el momento del ensayo se diluyó hasta una concentración final de 53,3 nM. Por otro lado se preparó una solución 160 mM de AAPH (Aldrich) en el mismo buffer. La mezcla de reacción estuvo formada por 1500 μl de fluoresceína diluida, preincubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, con 250 μl de la muestra correspondiente, buffer (control negativo CN), distintas diluciones de las muestras (diluciones 1:50, 1:100, 1:250 y 1:500) o distintas diluciones del Trolox (6,25 a 100 μM) utilizado como referencia. Por último, se agregaron 250 μl del AAPH y se realizaron lecturas de fluorescencia (λ_{exc} : 485 nm, λ_{em} : 535 nm) (espectrofluorómetro Twinkle LBQ70, Berthold Technologies) cada 2 minutos hasta los 35 minutos, incubando a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ entre lectura y lectura. En todos los casos se calculó la diferencia de área bajo la curva de decaimiento entre el blanco (sin AAPH) y la muestra. Y se realizó la curva de calibración con Trolox, calculándose el valor ORAC, expresado como concentración de Trolox equivalente a 1 mg de proteína, a través de la *Ecuación I.4*.

$$\text{Valor ORAC } (\mu\text{moles Trolox/mg proteína}) = \frac{(\text{AUC}_M - \text{AUC}_B) \times \text{molaridad Trolox}}{(\text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_B) \times \text{mg proteína}} \quad [\text{Ec. I.4.}]$$

I. 11.- Análisis estadístico.

Los datos correspondientes al grado de hidrólisis, solubilidad proteica y actividad antioxidante fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANAVA). Cuando las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$), los valores medios fueron evaluados mediante Diferencias Cuadradas Medias (LSD) usando el test de Fisher (paquete estadístico SYSTAT) (Wilkinson, 1990).

I.12.- Composición del aislado proteico.

El aislado proteico obtenido presentó la siguiente composición (base húmeda): $9,7 \pm 0,4$ g de hidratos de carbono/100 g, $79,1 \pm 0,1$ g de proteínas/100 g, $7,0 \pm 0,3$ g de agua/100 g, $3,2 \pm 0,1$ g de cenizas/100 g y $1,7 \pm 0,2$ % de lípidos.

I. 13.- Evaluación de diferentes condiciones de simulación de la digestión gastrointestinal.

Como ya se ha mencionado, los péptidos bioactivos pueden ser liberados de sus proteínas precursoras *in vitro* durante el procesamiento de los alimentos o *in vivo* durante la digestión gastrointestinal. Se ha demostrado que una buena estrategia para liberar estos péptidos es el uso de diversas enzimas propias del proceso de digestión gastrointestinal (Hernández-Ledesma y col., 2004). Dado que no se disponía en la literatura de trabajos que estudiaran la digestión gastrointestinal de las proteínas de amaranto, en esta etapa preliminar del trabajo, el objetivo fue optimizar las condiciones de la simulación *in vitro* de dicho proceso. Para ello, se optó por la utilización de un sistema sencillo focalizado en la digestión de las proteínas, aplicando una fase gástrica en la que el líquido estomacal fue simulado mediante una solución que contenía la enzima pepsina, NaCl 0,03 M y HCl (pH = 2); y una fase intestinal mediante una solución conteniendo la preparación enzimática pancreatina y NaHCO_3 (pH = 6).

La pepsina utilizada es una proteasa ácida obtenida de la mucosa estomacal porcina, que contiene una enzima proteolítica con actividad frente a un amplio rango de sustratos de alto peso molecular. Es una endopeptidasa de la familia de las proteasas aspárticas, compuesta por un grupo heterogéneo de ocho enzimas, con un pH óptimo entre 1,6 y 3,2, siendo inactivada cuando se varía el pH por encima de esos valores. Además de hidrolizar compuestos de alto peso molecular, también es capaz de hidrolizar péptidos de bajo peso molecular, en especial a aquellos que contienen en las extremidades residuos aromáticos, tirosina y cisteína. Su especificidad de escisión incluye sitios que contienen un residuo aromático a cada lado del enlace peptídico. Existe también un aumento a la susceptibilidad de la hidrólisis si hay un aminoácido que contiene azufre cerca del enlace peptídico, que

tiene un aminoácido aromático. La pepsina también escinde preferentemente en el lado carboxilo de la fenilalanina y leucina y, en menor medida, en el lado carboxilo de residuos de ácido glutámico, pero no es capaz de escindir en residuos de valina, alanina o glicina. Por último, cabe destacar, que la pepsina es capaz de actuar sólo cuando la proteína se encuentra parcialmente desplegada (Burrell y col., 1993).

Por su parte, la pancreatina, es un extracto de páncreas porcino compuesto por numerosas enzimas incluyendo amilasa, lipasa, ribonucleasa, tripsina y otras proteasas tales como carboxipeptidasa, quimotripsina y elastasa. Es capaz de hidrolizar grasas en glicerol y ácidos grasos, proteínas en polipéptidos y derivados, y almidón en dextrinas y azúcar. La tripsina, la quimotripsina y la elastasa son, también, endopeptidasas, pertenecientes al grupo de las serinproteasas. Cada una de ellas presenta una diferente especificidad, escindiendo enlaces peptídicos en los cuales el grupo carboxilo es aportado por: arginina o lisina para la tripsina, fenilalanina, triptófano o tirosina para la quimotripsina, y alanina, glicina o valina para la elastasa. Por otra parte, las carboxipeptidasas son exopeptidasas que atacan el extremo carboxilo terminal (Burrell y col., 1993; Ao y Li, 2013).

Se evaluó el efecto de distintas condiciones de digestión: distintas relaciones Pepsina/Proteína (Pep/Pro) y Pancreatina/Proteína (Pan/Pro) y distintos tiempos de incubación a 37 °C con cada enzima (t_1 y t_2), sobre el grado de hidrólisis (GH) y la concentración de proteínas en las fracciones solubles de los hidrolizados. Los resultados obtenidos pueden observarse en la *Tabla I. 1*. La muestra *Ais c* corresponde a un sistema en el cual el aislado fue sometido a condiciones similares que el resto de las muestras pero sin la presencia de ninguna de las enzimas, es decir, sólo fue sometido a las variaciones de pH, temperatura y agitación. En este caso particular, para los diferentes tiempos ensayados, se obtuvieron resultados similares, es por eso que sólo se presenta esta única muestra como sistema control.

Como puede observarse en la *Tabla I. 1.*, el aumento de las proporciones de Pep y Pan agregadas (*Apepa1* versus *Apepa4*) produjo un aumento significativo del GH ($p < 0,05$). Sin embargo, para relaciones Pep/Pro y Pan/Pro de 1/10, un aumento en el tiempo de exposición a la Pep entre 60 y 90 minutos (*Apepa3* versus *Apepa5*, *Apepa4* versus *Apepa6*), así como un aumento en el tiempo de contacto con pancreatina de 30 a 60 minutos (*Apepa3*

versus *Apepa4*, *Apepa5* versus *Apepa6*) no produjo cambios significativos en dicho parámetro ($p > 0,05$).

Tabla I. 1.- Efecto de las condiciones de hidrólisis sobre los valores de GH y solubilidad proteica

Muestra	Pep/Pro(p/p)	t ₁ (min)	Pan/Pro(p/p)	t ₂ (min)	GH	Conc. proteína soluble (mg/ml)
Ais	-	-	-	-	-	6,2 ± 0,2 ^a
Aisc	-	60	-	60	0,7 ± 0,1 ^a	2,9 ± 0,1 ^b
Apepa1	1/20	60	1/100	60	13,1 ± 1,4 ^b	6,6 ± 0,2 ^a
Apepa2	1/20	60	1/100	120	18,1 ± 1,5 ^c	6,0 ± 0,1 ^a
Apepa3	1/10	60	1/10	30	36,9 ± 1,0 ^d	5,5 ± 0,2 ^c
Apepa4	1/10	60	1/10	60	36,9 ± 0,5 ^d	5,5 ± 0,1 ^c
Apepa5	1/10	90	1/10	30	36,2 ± 1,6 ^d	5,7 ± 0,4 ^c
Apepa6	1/10	90	1/10	60	35,8 ± 0,2 ^d	5,5 ± 0,3 ^c

Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Dado que los ensayos de actividad antioxidante así como los de análisis y separación de los componentes deben ser realizados sobre muestras solubles, se evaluaron diferentes condiciones de obtención de las fracciones solubles a partir de las muestras liofilizadas. De esta manera, se concluyó que un tiempo de 60 minutos de incubación con agitación a 37 °C y 300 rpm de velocidad de agitación era suficiente para solubilizar la máxima cantidad posible de proteínas en sistemas de 10 mg de liofilizado/ml de buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8), dado que ni tiempos mayores ni una mayor velocidad de agitación producían un aumento de la cantidad de proteína soluble.

Utilizando las condiciones seleccionadas de solubilización, se evaluó la concentración de proteínas en las fracciones solubles obtenidas a partir de cada una de las muestras liofilizadas. Los resultados obtenidos se muestran también en la *Tabla I. 1*. Puede observarse que el tratamiento del aislado proteico a pH = 2 y luego a pH = 6 para obtener el sistema control (*Ais c*) produjo una significativa reducción de la solubilidad proteica ($p < 0,05$), indicando modificaciones en las proteínas que no pudieron ser luego revertidas al solubilizar en el buffer fosfato de pH = 7,8. En trabajos previos se ha demostrado que a baja

fuerza iónica, la solubilidad de los aislados proteicos de amaranto es baja en un rango de pH entre 4 y 6,3, lo cual se debe a que el punto isoeléctrico de las proteínas de amaranto se encuentra entre 4,5 y 6 (Marcone y Yada, 1992), por lo cual las proteínas del aislado precipitan por agregación inducida por la disminución de la repulsión electrostática. En cambio, el tratamiento con las enzimas digestivas, pepsina y pancreatina, produce un significativo aumento en la solubilidad ($p < 0,05$) en todas las condiciones ensayadas.

Además, se determinó el contenido proteico de cada liofilizado por el método de microKjeldahl (*Tabla I. 2*).

Tabla I. 2.- Solubilidad y concentración proteica de los digeridos.

Muestra	Proteína en liofilizado (mg/100 mg)	Proteína soluble (mg/100 mg liofilizado)	Solubilidad %
Ais (A)	74,6 \pm 5,6	25,7 \pm 3,0	34 \pm 4
Ape	-	45,2 \pm 0,2	-
Apepa1	72,3 \pm 3,1	39,4 \pm 1,4	60 \pm 6
Apepa2	69,3 \pm 4,5	37,5 \pm 0,1	58 \pm 4
Apepa3	79,3 \pm 2,5	49,5 \pm 3,8	62 \pm 5
Apepa4	76,1 \pm 0,7	45,2 \pm 1,6	59 \pm 2
Apepa5	65,8 \pm 4,4	48,9 \pm 2,7	74 \pm 4
Apepa6	76,1 \pm 7,8	48,4 \pm 4,0	64 \pm 5

En función de la concentración de proteína en los liofilizados, medida a través del ensayo de microKjeldahl, y de la cantidad de proteína solubilizada cada 100 mg de liofilizado, se calculó la solubilidad proteica de cada muestra como la cantidad de proteína solubilizada respecto a la cantidad total de proteína presente en los 100 mg de liofilizado (*Tabla I. 2*). Aunque es necesario tener en cuenta que dichas cantidades fueron determinadas por diferentes metodologías (Lowry y microKjeldahl), las cuales pueden arrojar valores no equivalentes, las solubilidades calculadas permiten igualmente comparar el comportamiento de las diferentes muestras. De acuerdo a los resultados se observa que aumentó de manera importante la solubilidad de los hidrolizados respecto al aislado.

Todos los digeridos presentaron una solubilidad de alrededor del 60 %, siendo el valor algo mayor en el caso de la muestra *Apepa5*.

I. 14.- Evaluación de la actividad antioxidante.

Se llevó a cabo una primera aproximación para estimar la potencial actividad antioxidante de los digeridos obtenidos a través de dos metodologías: secuestro del radical ABTS⁺ y método ORAC.

1. 14. a.- Secuestro del catión radical ABTS⁺.

Como se mencionó anteriormente, el método del ABTS es un ensayo de decoloración que permite determinar la capacidad de neutralizar radicales libres de antioxidantes de carácter hidrofílico e hidrofóbico. Se trata de un ensayo muy sencillo que permite realizar un primer screening de muestras con diversos componentes, tal como es el caso de las muestras en estudio.

En el presente trabajo se utilizaron las condiciones previamente optimizadas en nuestro laboratorio para este ensayo (Tironi y Añón, 2010). Se determinó, en primer término, la absorbancia en función del tiempo (entre $t = 0$ y $t = 10$ minutos), observándose que si bien las distintas muestras presentaban inicialmente diferentes velocidades de reacción, en todos los casos, los valores de absorbancia se estabilizaban a partir de los 8 minutos; por ello, se decidió trabajar con los valores de absorbancia en el punto final (10 minutos), asegurando alcanzar la máxima decoloración. Luego, con dichos valores de absorbancia, se calculó el % de secuestro del radical para cada dilución de cada muestra y se graficó en función de la concentración proteica. Se observó en todos los casos, una actividad dependiente de la concentración, de ajuste logarítmico excepto en el caso de *Aís c*, en la que el mejor ajuste fue lineal (*Figura I. 5*).

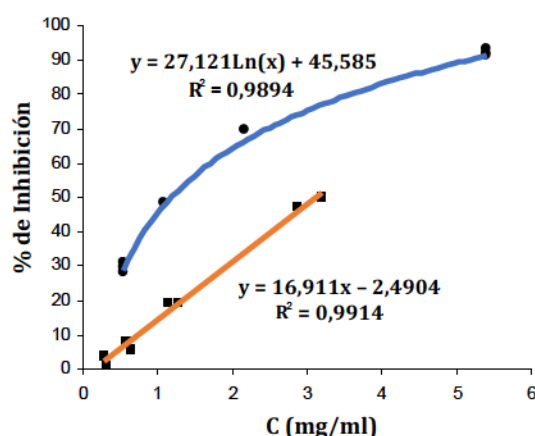


Figura 1. 5.- Curvas dosis-respuesta de la actividad secuestrante del ABTS⁺ de Ais c (■) y Apepa4 (●)

En la *Figura 1. 5*, se muestra también la curva correspondiente a *Apepa4*, a modo de ejemplo. Los valores de IC₅₀ de todas las muestras se calcularon utilizando los parámetros de regresión; los valores obtenidos se muestran en la *Tabla 1. 3*. en comparación con aquellos correspondientes al Trolox. A mayor valor de IC₅₀ menos potente será la muestra como antioxidante, ya que se requiere una concentración de péptidos/proteínas mayor para poder lograr la misma inhibición (50 %).

El valor obtenido para *Ais* fue comparable con aquellos valores previamente informados por Tironi y Añón (2010) para los aislados de *A. mantegazzianus*. En la muestra que no fue sometida a tratamiento enzimático, *Ais c*, el solo cambio del pH (pH = 2 primero y luego pH = 6), produjo un reducción significativa del IC₅₀ ($p < 0,05$), indicando un aumento en el potencial antioxidante de los componentes solubles de la muestra. Este efecto podría ser atribuido a la insolubilización, debida al pH, de ciertos polipéptidos con baja o nula actividad antioxidante presentes en el aislado y/o a la contribución de péptidos más activos. En todos los casos en los que el aislado fue tratado con pepsina y pancreatina, se observó una disminución significativa del IC₅₀ respecto del control ($p < 0,05$).

Todos los hidrolizados que presentaron un GH elevado (*Apepa3* a *Apepa6*) mostraron una capacidad antioxidante similar, la cual no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) con la actividad de *Apepa2* (*Tabla 1. 3*), cuyo valor de GH fue un 50 % inferior y en algunos de los casos con la actividad de *Apepa1*, con un GH aún menor (*Tabla 1. 1*). Comparando con el valor de IC₅₀ obtenido para *Ais* podemos concluir que la hidrólisis proteica produjo la

liberación de péptidos antioxidantes en todos los casos, pero que un aumento del GH no se relaciona necesariamente con un aumento del potencial antioxidante de las muestras medido por este método.

Si bien los valores de IC_{50} de los hidrolizados fueron mayores que el correspondiente al de Trolox (*Tabla I. 3*), es importante tener en cuenta que los hidrolizados están formados por una mezcla de especies, las cuales pueden presentar diferentes características antioxidantes, es decir, puede haber presentes moléculas pro-oxidantes, otras que no presenten actividad y otras con actividad antioxidante, en la misma muestra; mientras que el Trolox es un compuesto puro, con reconocido potencial antioxidante. En trabajos previos, un aislado proteico de trigo sarraceno se expuso a la acción de la pepsina (1/25 pep/pro) durante 60 minutos y luego a la de la pancreatina (1/25 pan/pro) durante 120 minutos, produciendo la hidrólisis un aumento en su capacidad de secuestro del radical $ABTS^+$ (Ma y col., 2010).

Tabla I. 3.- Actividad antioxidante de las muestras:

IC_{50} para el secuestro del $ABTS^+$ y Valor ORAC

Muestras	IC_{50} (mg prot/ml)	Valor ORAC (μ g Trolox/ μ g prot)
Ais	$9,61 \pm 0,04^a$	$0,112 \pm 0,018^a$
Ais c	$2,98 \pm 0,35^b$	$0,199 \pm 0,006^b$
Apepa1	$1,71 \pm 0,45^c$	$0,201 \pm 0,001^b$
Apepa2	$1,65 \pm 0,04^{c,d}$	$0,308 \pm 0,007^c$
Apepa3	$1,16 \pm 0,09^d$	$0,207 \pm 0,001^b$
Apepa4	$1,36 \pm 0,26^{d,c}$	$0,288 \pm 0,003^c$
Apepa5	$1,17 \pm 0,03^d$	$0,276 \pm 0,002^c$
Apepa6	$1,22 \pm 0,21^{d,c}$	$0,199 \pm 0,003^b$
Trolox	$0,28 \pm 0,04$	-

Subíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

I. 14. b.- Método ORAC.

A través del método ORAC es posible medir la capacidad “secuestrante” de radicales peróxilos (generados a partir de AAPH a 37 °C), determinándose experimentalmente la degradación oxidativa de la fluoresceína utilizada como sonda fluorescente. La pérdida de fluorescencia es, por lo tanto, un indicativo del daño que está sufriendo la fluoresceína por su reacción con radicales peróxilo. Como ya se mencionó anteriormente, aquellos compuestos con capacidad antioxidante protegerán a dicha molécula de la degradación oxidativa, inhibiendo o disminuyendo la pérdida de fluorescencia. Se ensayaron distintas concentraciones de las muestras y del Trolox, obteniéndose las correspondientes curvas y sus respectivas AUC para cada una de las concentraciones ensayadas. Se obtuvo una curva de calibración graficando los valores de las AUC en función de las correspondientes concentraciones de Trolox (*Figura I. 6*), a partir de la cual se pudieron calcular los valores Trolox eq (TE).

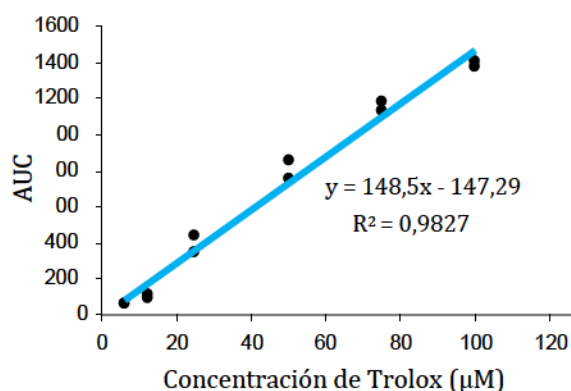


Figura I. 6.- Curva de calibración del Trolox para el ensayo ORAC.

En la *Figura I. 7* se presentan las curvas de TE en función de la concentración proteica para cada una de las muestras en estudio. Mientras que algunas muestras, como *Ais* y *Ais c* (*Figura I. 7. a*) y *Apepa3* y *Apepa6* (*Figura I. 7. c*) presentaron una respuesta lineal de los valores de TE con el aumento de la concentración, un segundo grupo de muestras presentaron un ajuste logarítmico de sus curvas, como *Apepa1* y *Apepa2* (*Figura I. 7. b*) y *Apepa4* y *Apepa5* (*Figura I. 7. d*), indicando una concentración de saturación, a partir de la cual el efecto interruptor de la cadena radicalaria no aumenta con el incremento de la concentración proteica. Estos resultados sugieren que el segundo grupo de muestras, que presenta un comportamiento logarítmico, tendría un mayor efecto antioxidante, dado que

son capaces de alcanzar una saturación con menores concentraciones proteicas. Un mayor valor de TE, que se corresponde con una menor disminución de la fluorescencia, es indicativo de una mayor capacidad antioxidante de las muestras.

La comparación de las curvas permite apreciar que los valores de TE aumentaron luego del tratamiento del aislado a pH 2 y 6 (*Figura I. 7. a*), lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos para el ensayo del ABTS⁺. Comparando los digeridos respecto del control, vemos que en todos los casos el valor TE aumentó. La *Figura I. 7. b*. muestra el comportamiento de los digeridos preparados a partir de las menores proporciones de enzimas/proteínas (*Apepa1* y *Apepa2*, ver *Tabla I. 1*), siendo los valores de TE dependientes de los tiempos de reacción de las enzimas, ya que fueron mayores para *Apepa2* (muestra obtenida aplicando mayor tiempo de acción de la pancreatina). En el caso de los hidrolizados obtenidos con mayores relaciones enzimas/proteínas, dos de ellos presentaron un comportamiento lineal (*Apepa3* y *Apepa6*, *Figura I. 7. c*), mientras que *Apepa4* y *Apepa5* presentaron un comportamiento logarítmico, muy similar para ambas muestras, en el rango de concentraciones ensayadas (*Figura I. 7. d*). En este último caso, se puede observar un comportamiento lineal, hasta una concentración de 0,06 mg/ml.

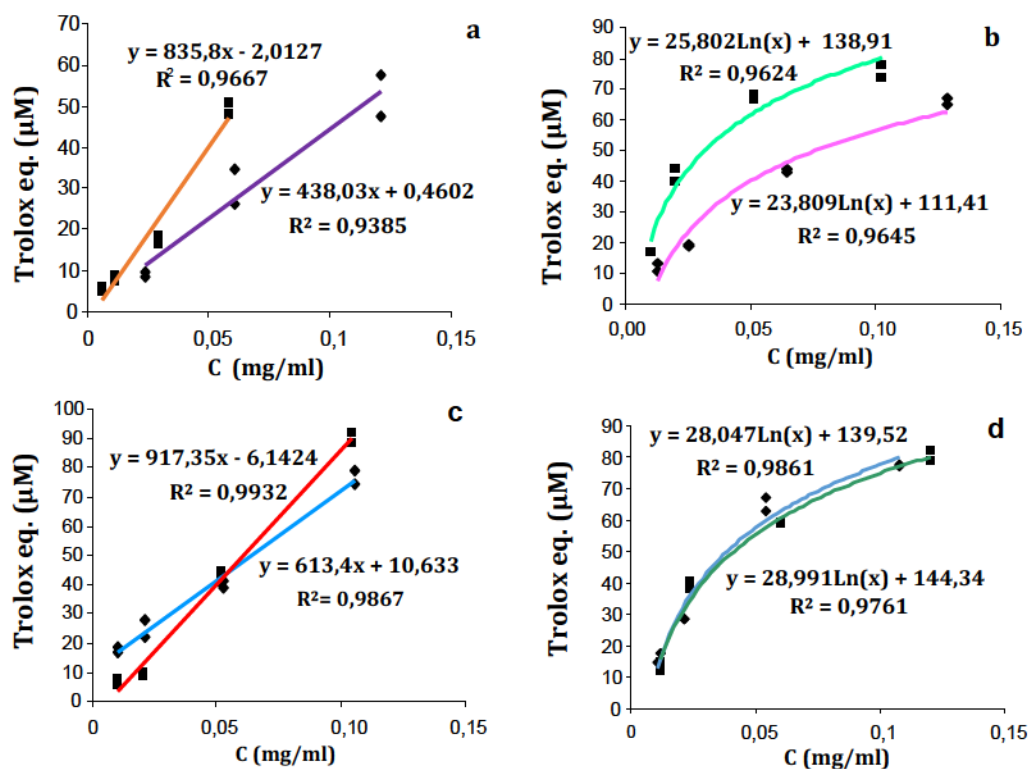


Figura I. 7.- Curvas dosis-respuesta de las fracciones solubles para el ensayo ORAC.

a) ♦ Ais, ■ Ais c; b) ♦ Apepa1, ■ Apepa2; c) ♦ Apepa3, ■ Apepa 6; d) ♦ Apepa4, ■ Apepa5.

Con el objetivo de poder comparar el potencial antioxidante de los diferentes hidrolizados se calculó el *valor ORAC*, el cual indica a cuántos μg de Trolox equivale el efecto antioxidante producido por 1 μg de proteína, por lo tanto, un mayor *valor ORAC* indica una mayor capacidad antioxidante. Como se muestra en la *Tabla 1. 3.*, las muestras *Apepa2*, *Apepa4* y *Apepa5* presentaron mayor potencial antioxidante que el resto de los digeridos mediante el presente ensayo ($p < 0,05$). Por otro lado, *Apepa1*, *Apepa3* y *Apepa6*, mostraron un valor ORAC similar ($p > 0.05$) al del sistema control (*Ais c*). Por lo tanto, de acuerdo con estos resultados, la actividad evaluada por este ensayo, al igual que para el ensayo anterior, no presenta una relación directa con el grado de hidrólisis ya que si bien las muestras *Apepa3* a *Apepa6* presentaron GH similares, su comportamiento fue diferente. Además, *Apepa2* presentó valores ORAC similares a *Apepa4* y *Apepa5*, pero un GH mucho menor (50 % menor).

I. 15.- Selección de las condiciones de digestión gastrointestinal simulada.

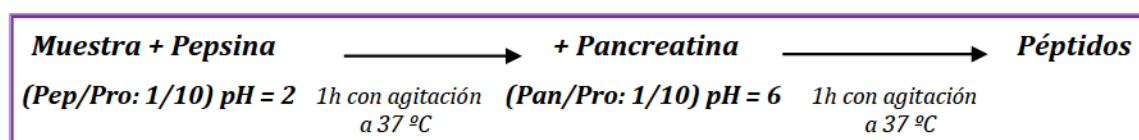
Aunque el comportamiento frente al radical ABTS^+ no fue equivalente al registrado para el ensayo ORAC, ninguna de las dos actividades fue directamente dependiente del GH. Estos resultados sugieren que lo importante es la naturaleza y composición de los péptidos, lo cual sería un factor determinante en la actividad antioxidante de los mismos. Clausen y col. (2009) estudiaron la actividad antioxidante mediante los ensayos de ABTS y ORAC de las proteínas de la leche, concluyendo que tanto la composición como la exposición al solvente de los aminoácidos, juegan un rol fundamental en la actividad de las proteínas. En contraposición, al analizar la actividad de los aminoácidos libres, se observó que los mismos presentaron mayor potencial frente al ORAC que al ABTS^+ , lo cual fue relacionado con el mayor tamaño del radical ABTS^+ comparado con los radicales peroxilo (Clausen y col., 2009). Por otra parte, mientras que el método del ABTS mide exclusivamente la capacidad de los antioxidantes para neutralizar los radicales preformados de ABTS^+ , tanto a través de la donación de átomos de hidrógeno como de electrones, algunos autores han postulado que el ensayo ORAC evaluaría tanto la capacidad de inhibir la iniciación como la propagación de la cadena radicalaria (Ma y col., 2010). Sin embargo, otros autores postulan que dicho ensayo mide solo la capacidad de los antioxidantes de reaccionar frente a radicales peroxilo, a través de la transferencia de átomos de hidrógeno, interrumpiendo la cadena radicalaria (Ou y col., 2001). Además, ciertos iones contenidos en fluidos biológicos

y en productos naturales, serían capaces de reducir el ABTS⁺ a ABTS, provocando resultados por encima de los reales (Ou y col., 2001). Estas son algunas posibles causas que justificarían las diferencias detectadas entre ambos ensayos.

Por otra parte, el ensayo ORAC es más interesante desde un punto de vista de la potencial actividad biológica de los péptidos, debido a que los radicales peroxilo, que se evalúan a través de este método, se encuentran presentes en el organismo humano, ya que son formados por homólisis de los hidroperóxidos durante la oxidación de los ácidos grasos (Almeida y col., 2008), mientras que el ABTS⁺ es un radical sintético preformado.

Nuestro objetivo, en estos primeros ensayos, fue seleccionar condiciones de digestión gastrointestinal *in vitro* de las proteínas de amaranto que permitieran una simulación del proceso *in vivo*, evaluando a la vez la potencial actividad antioxidante de los digeridos. Si bien los digeridos *Apepa2*, *Apepa4* y *Apepa5* fueron los que presentaron las mayores actividades, con valores similares (especialmente por el método ORAC), la extensión de la digestión es diferente en el caso de *Apepa2*. El largo promedio de las cadenas peptídicas (MLP = Mean length of the peptide chains) puede ser estimado a través del grado de hidrólisis como $MLP = 100/GH \%$ (Adler - Nissen, 1979). En este sentido, *Apepa2* (GH = 18,1 %) presenta un valor de MLP de 5,5 aminoácidos, mientras que *Apepa4* y *Apepa5* (GH = 36,9 % y 36,2 % respectivamente) muestran un valor de MLP de 2,7 aminoácidos. Por lo tanto, consideramos que estas últimas muestras podrían reflejar mejor el proceso de digestión gastrointestinal *in vivo*. Entre ambas, se decidió continuar el estudio con la muestra *Apepa4*, la cual fue obtenida exponiendo al aislado al mismo tiempo de acción (60 minutos) con cada una de las preparaciones enzimáticas.

En función de lo expuesto, las condiciones de digestión gastrointestinal simulada a utilizar en el resto del trabajo serán:



I. 16.- Simulación de la digestión gastrointestinal sobre un hidrolizado de amaranto con alcalasa.

Una vez seleccionadas las condiciones de digestión, las mismas fueron aplicadas a un aislado de amaranto hidrolizado previamente con alcalasa, de manera de comparar los resultados obtenidos para esta muestra con aquellos obtenidos para el aislado sin hidrolizar, y de evaluar a ambos como potenciales ingredientes funcionales.

Las condiciones a las que se sometió la muestra fueron entonces relación Pepsina/Proteína 1/10 p/p, pH = 2, con agitación a 37 °C durante 60 minutos y una relación Pancreatina/Proteína 1/10 p/p, pH = 6, con agitación a 37 °C durante 60 minutos, deteniendo la reacción por calentamiento a 85 °C durante 10 minutos.

La alcalasa es obtenida por fermentación sumergida de una cepa de *Bacillus licheniformis*; su principal componente enzimático es la subtilisina de Carlsberg, que es una endoproteinasa de tipo serínico, la cual, como todas las serinproteasas, inicia el ataque nucleofílico en el enlace peptídico mediante un residuo de serina que posee en su centro activo. La subtilisina de Carlsberg actúa a pHs comprendidos entre 6 y 10 e hidroliza enlaces peptídicos donde se encuentran aminoácidos grandes sin carga; si bien es una proteasa relativamente inespecífica, en estudios sobre cinética de la hidrólisis se ha encontrado una gran especificidad hacia la glicina como residuo, con predilección por residuos grandes hidrofóbicos unidos a ella, la glicina flanqueada por dos aminoácidos hidrofóbicos grandes pareciera ser la mínima secuencia de aminoácidos necesaria para una secuencia efectiva de la subtilisina (Bratovanova y Petkov, 1987). La alcalasa libera, por lo tanto, en su mayoría péptidos con aminoácidos hidrofóbicos en su C-terminal, los cuales son capaces de interaccionar y formar agregados insolubles estabilizados por interacciones hidrofóbicas, lo cual se verá favorecido a pHs cercanos al pI promedio de las proteínas.

El hidrolizado con alcalasa utilizado (*Halc*) presentó un GH de $29,2 \pm 1,3$ %, previo a la digestión. Este tipo de hidrolizado de amaranto ha demostrado poseer actividad antioxidante no sólo a través del método del ABTS⁺ sino también a través del ensayo de inhibición de la oxidación del ácido linoleico, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Tironi y Añón, 2010).

I. 6. a.- Grado de hidrólisis.

La *Figura I. 8.* muestra la progresión del GH luego de cada paso de la simulación de la digestión gastrointestinal para *Halc* en comparación con *Ais*: inicialmente ($t = 0$), luego del tratamiento con pepsina ($t = 60$ minutos) y luego del tratamiento con pancreatina ($t = 120$

minutos). A partir de este momento, los digeridos serán denominados *AisDIG* y *HalcDIG* respectivamente. Es importante remarcar que, aunque inicialmente ambas muestran presentaban valores de GH muy diferentes ($Ais \approx 0$ y $Halc = 29,2 \pm 1,3$), los valores a los que llegaron al final de la digestión no fueron muy diferentes, apenas mayor en el caso del hidrolizado con alcalasa ($36,9 \pm 0,5$ y $42,0 \pm 2,6$ para *AisDIG* y *HalcDIG*, respectivamente).

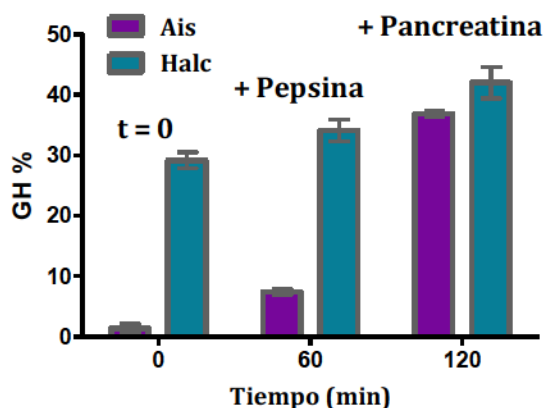


Figura I. 8.- GH% en función de la progresión de la digestión gastrointestinal.

De acuerdo a los resultados, se puede observar que la extensión de la acción de las enzimas digestivas fue menor en aquellas muestras que previamente habían sido tratadas con alcalasa. La alcalasa, al igual que varias de las proteasas pancreáticas, es una serinproteasa, pero con un amplio rango de especificidad (Chabanon y col., 2007); por lo tanto, la alcalasa podría haber escindido ciertos sitios que serían sitios específicos de acción de las proteasas digestivas y por eso no se observarían grandes diferencias en el GH antes y después de la digestión gastrointestinal de esta muestra.

I. 16. b.- Actividad antioxidante.

Se evaluó la actividad antioxidante de las muestras antes (*Halc*) y después de someterlas al proceso de digestión gastrointestinal simulada (*HalcDIG*), por las dos metodologías utilizadas previamente para el aislado y sus digeridos.

I. 16. b. 1.- Secuestro del catión radical ABTS⁺.

En la *Figura I. 9. a* pueden observarse las curvas dosis-respuesta de las muestras, presentando ambas un comportamiento logarítmico. Se calcularon los valores de IC₅₀ a partir de dichas curvas de regresión, siendo $1,44 \pm 0,03$ mg/ml para *Halc* y $1,02 \pm 0,04$ mg/ml para *HalcDIG*. En concordancia con estudios previos de Tironi y Añón (2010), la hidrólisis con alcalasa incrementó el potencial antioxidante, lo cual se puede verificar al comparar el valor de IC₅₀ de *Halc* con el de *Ais* ($9,61 \pm 0,04$ mg/ml), siendo el primero significativamente menor ($p < 0,05$). Sin embargo, luego de la digestión gastrointestinal simulada, la actividad antioxidante de *HalcDIG* no varió significativamente con respecto a la actividad de *Halc* ($p > 0,05$). Por otro lado, al comparar las muestras *AisDIG* (IC₅₀ $1,36 \pm 0,26$ mg/ml) con *HalcDIG* puede observarse que la hidrólisis previa con alcalasa no mejora el potencial antioxidante de los aislados proteicos evaluados a través de esta metodología, siendo los correspondientes valores de IC₅₀ estadísticamente similares ($p > 0,05$).

I. 16. b. 2.- Ensayo ORAC.

En la *Figura I.9.b* se muestran las curvas dosis-respuesta para *Halc* y *HalcDIG*. Se observó un comportamiento lineal para *Halc*, mientras que para *HalcDIG* el comportamiento fue logarítmico en el rango de concentraciones ensayadas, con un rango de linealidad hasta una concentración de 0,05 mg/ml. Los valores ORAC obtenidos fueron $0,22 \pm 0,01$ y $0,30 \pm 0,01$ µg Trolox/µg proteína para *Halc* y *HalcDIG*, respectivamente, observándose diferencias significativas entre dichos valores. Estos resultados sugieren que la digestión gastrointestinal simulada produjo un aumento de la actividad antioxidante de los hidrolizados de alcalasa, especialmente a bajas concentraciones.

Al igual que en el caso del ensayo del ABTS, el potencial antioxidante de *HalcDIG* fue similar al de *AisDIG* ($p > 0,05$).

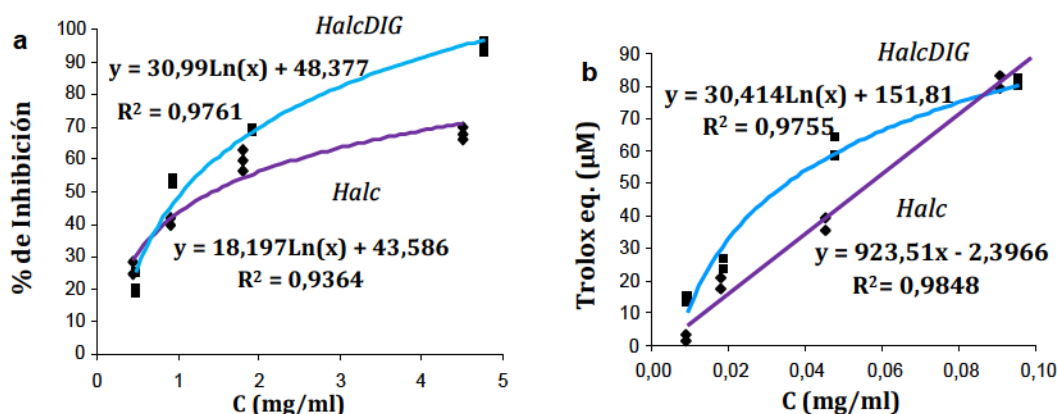


Figura 1. 9.- Actividad antioxidante de Halc (◆) y HalcDIG (■):

a) Secuestro del catión radical ABTS⁺; b) Ensayo ORAC.

I. 17.- Caracterización molecular de las muestras.

I. 17. a.- Electroforesis SDS-PAGE en gel de tricina.

Se analizaron las fracciones solubles de cada muestra mediante SDS-PAGE en geles de tricina, metodología que permite detectar péptidos de baja masa molecular. Se sembraron dos mezclas de proteínas patrones de masas moleculares conocidas: un patrón de muy baja masa molecular (*Figura 1. 10 - calle 2*) y otro con proteínas de baja masa molecular (*Figura 1. 10 - calle 1*). Si bien la mezcla de patrones de muy baja masa contenía péptidos de 3,50 y 1,42 kDa, los mismos no pudieron ser detectados, por lo que en estos geles fue posible visualizar moléculas de hasta alrededor de 6,5 kDa o mayores. El perfil electroforético del aislado proteico sin hidrolizar (*Ais*, *Figura 1. 10 - calle 3*) presentó moléculas con masas moleculares mayores a 26,6 kDa que podrían corresponder a las subunidades ácidas de la globulina 11S del amaranto (29,3 y 32,0 kDa) y una banda que correspondería a las subunidades básicas de estas proteínas (20,8 kDa). Además, se pueden observar diversas bandas con masas moleculares menores a 20 kDa que corresponderían a las albúminas (Segura Nieto y col., 1994). Luego de la hidrólisis del aislado con pepsina y pancreatina (*AisDIG*, *Figura 1. 10 - calle 4*), todas las bandas correspondientes a masas moleculares mayores a 14 kDa desaparecen, apareciendo sólo dos bandas nuevas de 45 y 18 kDa (bandas 12 y 13, *Figura 1. 10*). Sin embargo, la disminución de la intensidad total de la muestra sugiere que una importante proporción de los péptidos generados por la digestión gastrointestinal simulada tendrían masas moleculares menores al límite de detección del gel (6,5 kDa). El análisis del perfil correspondiente al aislado hidrolizado con alcalasa

(*Halc*) (Figura I. 10, calle 5) muestra que algunas de las bandas intensas que aparecían en el aislado en la porción superior del gel (> 30 kDa) desaparecen luego de la hidrólisis con alcalasa, mientras que aparecen nuevas bandas, evidenciando la generación de nuevos péptidos de diversos masas moleculares, especialmente menores que 16,95 kDa. Por último, al someter a *Halc* a la digestión gastrointestinal simulada (*HalcDIG*) (Figura I. 10, calle 6), se observa que, al igual que en el caso de *AisDIG*, la mayoría de las bandas presentes en *Halc* desaparecen, lo cual estaría indicando que dichos polipéptidos habrían sido atacados por las enzimas digestivas, generando péptidos pequeños que no pueden ser detectados en este gel. Sólo puede observarse como producto de la digestión de *Halc* una banda muy tenue con masa molecular mayor a 30 kDa (*banda 14, calle 6*).

En síntesis, se podría concluir que luego de someter ambas muestras a la digestión gastrointestinal simulada, los perfiles electroforéticos de los digeridos presentan algunas diferencias, evidenciando la generación de diferentes especies moleculares en cada una de las muestras. Sin embargo, en estos análisis solo se están evidenciando algunos de los constituyentes de los digeridos; los mismos sugieren que una gran proporción de las moléculas constituyentes tendrían masas moleculares menores a 6,5 kDa.

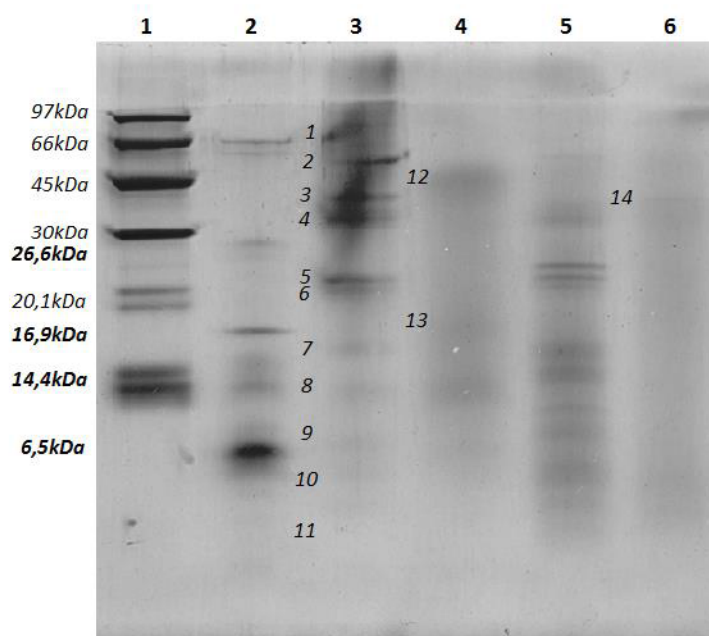


Figura I. 10.- Gel de tricina en electroforesis SDS-PAGE: 1) Patrones de bajo peso molecular, 2) Patrones de muy bajo peso molecular (indicados en negro más oscuro), 3) *Ais*, 4) *AisDIG*, 5) *Halc*, 6) *HalcDIG*.

I. 17. b.- Caracterización de los hidrolizados mediante RP-HPLC preparativa.

A fin de obtener más información sobre el efecto que tuvo a nivel molecular la acción de las enzimas, se llevaron a cabo corridas de RP-HPLC. Aunque se utilizó una columna de escala preparativa, los volúmenes sembrados fueron pequeños (200 μ l), por lo que podrían considerarse como corridas semi-preparativas. En la *Figura I. 11* se presentan a modo comparativo los cromatogramas obtenidos para las cuatro muestras (*Ais*, *AisDIG*, *Halc* y *HalcDIG*). Al comparar *Ais* con *Halc* (*Figura I. 11. a*), se observa que luego de la hidrólisis con alcalasa disminuyen varios componentes con t_R entre 35 y 50 minutos, hidrofóbicos, y aumentan considerablemente las fracciones con t_R entre 10 y 30 minutos, más hidrofílicas y, probablemente, más pequeñas que las anteriores. En la *Figura I. 11. b* se puede observar que luego de la digestión gastrointestinal del aislado ocurre algo similar a lo que ocurre luego de la hidrólisis con alcalasa (*Figura I. 11. a*), produciéndose un marcado aumento de fracciones con t_R entre 10 y 30 minutos, más hidrofílicas y también probablemente de menor masa molecular. Luego, si se compara el hidrolizado con alcalasa con su digerido (*Figura I. 11. c*), se registra una disminución en la intensidad de las fracciones con t_R entre 20 y 40 minutos, sugiriendo el ataque de estas moléculas por las enzimas gastrointestinales. Y, por último, al comparar ambos digeridos (*Figura I. 11. d*) se puede apreciar que tampoco existen grandes diferencias entre los cromatogramas, sólo una intensidad algo menor en las fracciones comprendidas entre los 22 y los 40 minutos de *HalcDIG* respecto a *AisDIG*, sugiriendo que permanecen en esta última muestra una mayor proporción de moléculas con mayor nivel de hidrofobicidad.

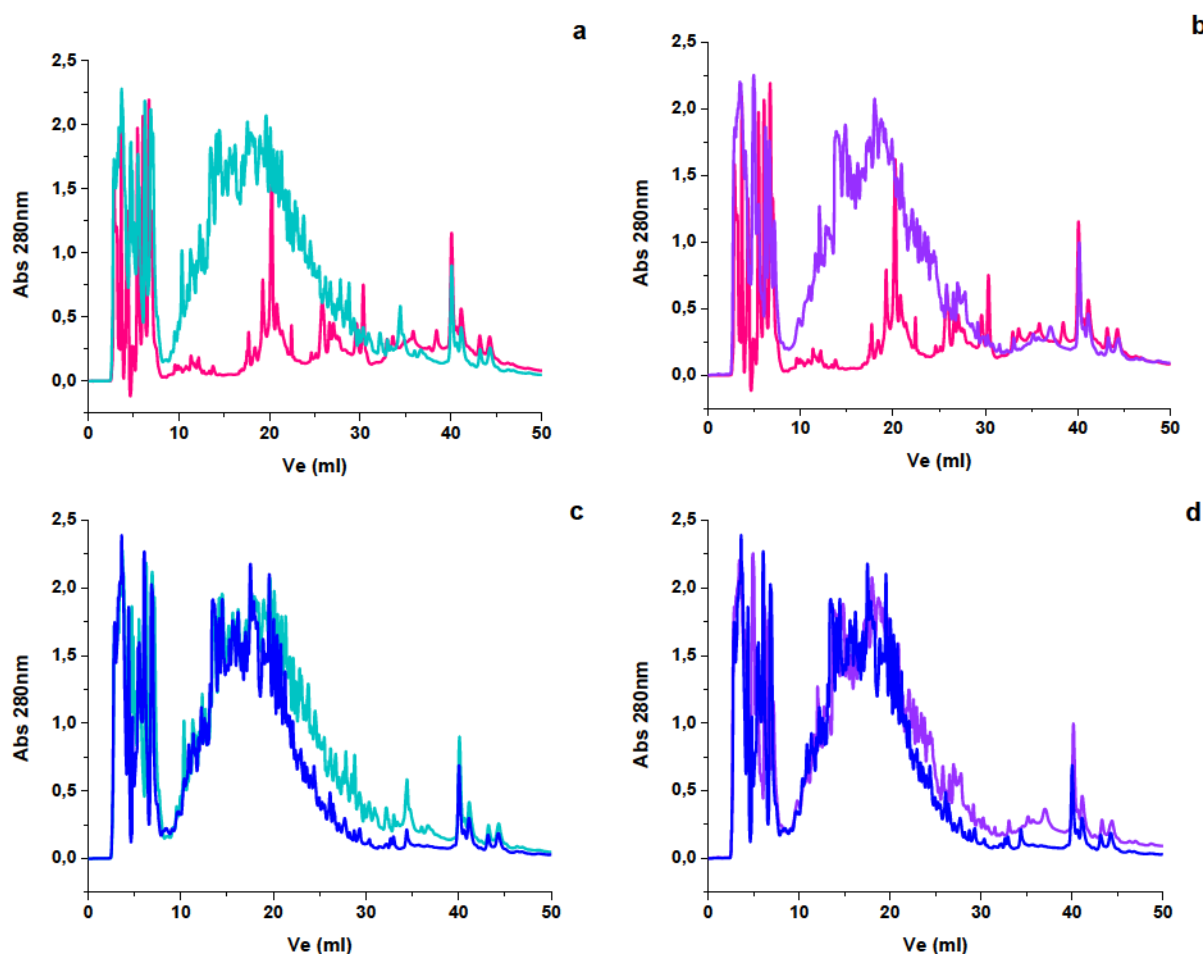


Figura I. 11.- Cromatogramas obtenidos por RP-HPLC preparativa.

a) *Ais-Halc*, b) *Ais-AisDIG*, c) *Halc-HalcDIG*, d) *AisDIG-HalcDIG*.

I. 17. c.- Cromatografía FPLC de exclusión molecular.

Se realizaron corridas de cromatografía de exclusión molecular (FPLC), utilizando dos columnas con diferentes rangos de resolución. Primero se utilizó la columna Superdex 75 con un límite de exclusión de 100 kDa y un rango de separación de entre 3 y 70 kDa. La cual fue calibrada utilizando azul dextrano ($V_0 = 7,3$ ml), albúmina (67 kDa), quimotripsina (25 kDa), ribonucleasa A (19 kDa), ovoalbúmina (9,2 kDa) y aprotinina A (6,5 kDa), obteniéndose la siguiente expresión para el cálculo de la masa molecular: $\log MM = 1,96 - 2,30 \times K_{av}$ ($r^2 = 0,961$).

La Figura I. 12 muestra los cromatogramas obtenidos utilizando dicha columna. En el caso de *Ais*, la muestra soluble presentó 5 picos principales (Figura I. 12. a). Al analizar la fracción soluble de *Halc* (Figura I. 12. a) se observa una importante disminución del pico 1

acompañada por la aparición de diversos picos correspondientes a masas moleculares menores a 25 kDa. Al analizar el efecto del tratamiento a pH = 2 y pH = 6 sobre el aislado, *Ais c* (Figura I. 12. b) se observan cambios en el cromatograma dados por una disminución importante del área del *pico 1* (moléculas entre 40 y 70 kDa), sin modificaciones apreciables en los *picos 3, 4 y 5* (moléculas con masas moleculares menores a 6,5 kDa). La disminución de moléculas correspondientes al *pico 1* podría ser la responsable de la baja solubilidad que presentó *Ais c*. Además, apareció un nuevo pico (*1c* – Figura I. 12. b), con una masa molecular cercana a los 19 kDa. Luego de la digestión gastrointestinal (*AisDIG*) se pudo observar una disminución adicional de los *picos 1 y 1c*, lo cual indicaría que estos polipéptidos habrían sido atacados por las enzimas gastrointestinales, generando diversas moléculas con pesos moleculares menores a 19 kDa (Figura I. 12. b).

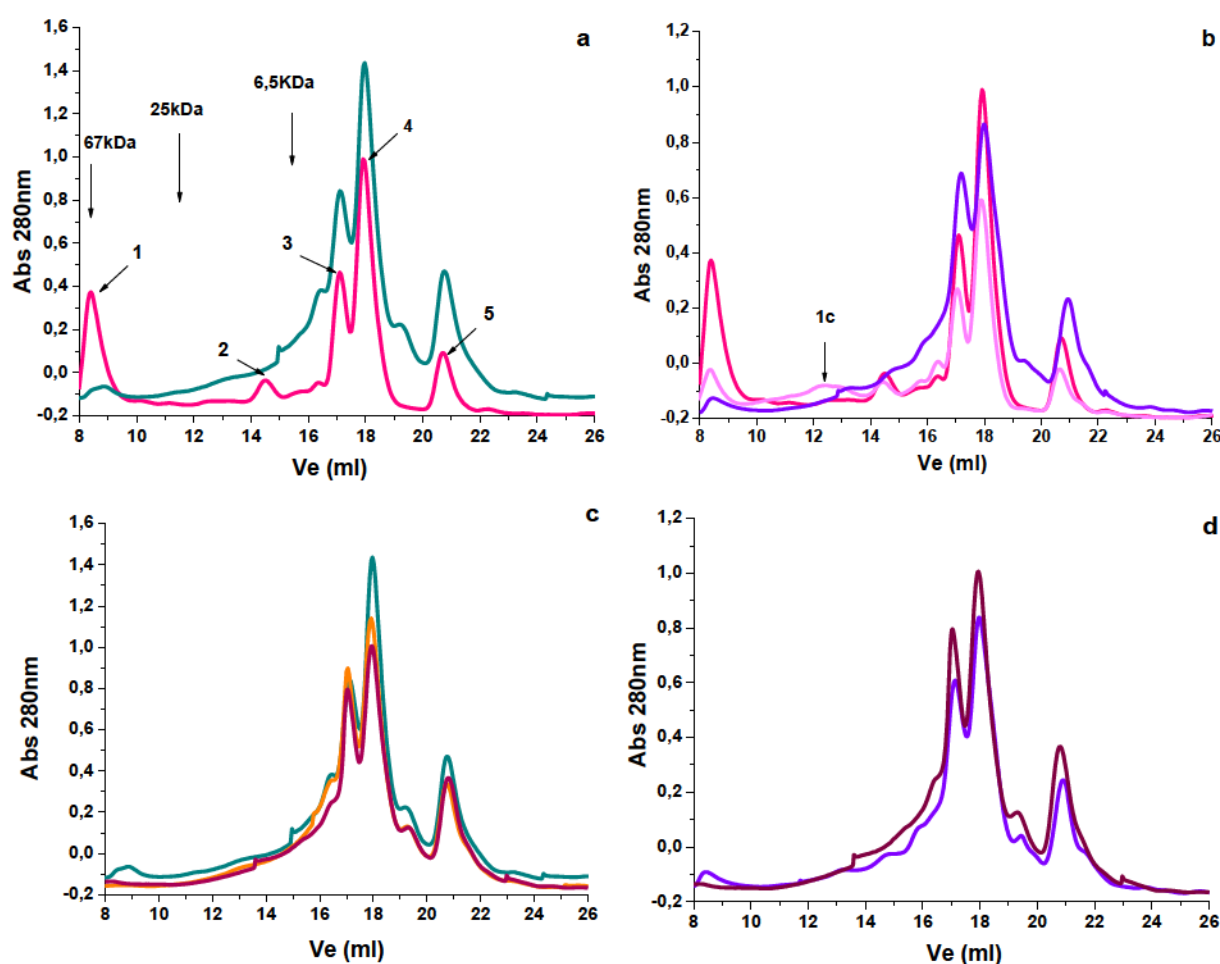


Figura I. 12.- Cromatogramas de exclusión molecular de las fracciones solubles, columna Superdex 75.
a) *Ais* – *Halc*; b) *Ais* – *Ais c* – *AisDIG*; c) *Halc* – *Halc c* – *HalcDIG*; d) *AisDIG* – *HalcDIG*

Cuando el hidrolizado con alcalasa es tratado a pH = 2 y pH = 6, sin agregado de enzimas gastrointestinales (*Halc c*) se presentan ciertos cambios respecto a *Halc*, entre ellos la completa desaparición del *pico 1* y la disminución de las áreas de otros picos (*Figura I. 12. c*). La hidrólisis de *Halc* con pepsina y pancreatina (*HalcDIG*) no produjo cambios adicionales importantes en el perfil cromatográfico, excepto por pequeños aumentos de especies moleculares que presentaron volúmenes de elución de 16 ml aproximadamente y también del *pico 4* (*Figura I. 12. c*). Por último, al hacer una comparación entre los digeridos (*AisDIG* y *HalcDIG*), se observa que *HalcDIG* contendría una mayor proporción de moléculas con masas moleculares menores a 19 kDa, aunque las diferencias entre ambas son muy pequeñas (*Figura I. 12. d*).

A fin de poder analizar las moléculas de masas moleculares menores, las mismas muestras fueron corridas utilizando otra columna, la Superdex 30, que presenta un rango de separación óptimo por debajo de los 10 kDa. La calibración de dicha columna se realizó utilizando azul dextrano para determinar el volumen de exclusión ($V_0 = 8,15$ ml), aprotinina (6500 Da), una mezcla de péptidos comerciales (1046,2, 573,7, 555,6, 379,5 y 238,2 Da) (Sigma) y tirosina (181,2 Da) como patrones de masa molecular conocida. Se obtuvo la siguiente expresión para el cálculo de la masa molecular (kDa): $\log MM = 1,52 - 2,52 \times K_{av}$ ($r^2 = 0,986$) siendo $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$ y V_e el volumen de elución.

La fracción soluble del aislado (*Ais*) presentó 6 picos principales (*Figura I. 13. a*). Al realizar la hidrólisis con alcalasa se observa la aparición de una elevada proporción de moléculas con pesos moleculares menores a 6,5 kDa (*Figura I. 13. a*). Por otra parte, luego del tratamiento a pH = 2 y pH = 6 del aislado (*Ais c*) se observó una disminución del *pico 1* (moléculas con pesos moleculares mayores a 10 kDa) y del *pico 5* (pesos moleculares menores a 0,55 kDa), y un aumento de moléculas con pesos moleculares entre 6 y 10 kDa (*Figura I. 13. b*). Mientras que después de la digestión con pepsina y pancreatina (*AisDIG*) se produjo una pérdida de moléculas con pesos moleculares mayores a 10 kDa (*pico 1*) y un aumento considerable de diversas moléculas de pesos moleculares menores a 6,5 kDa, incluyendo moléculas muy pequeñas (*picos 5 y 6*) (*Figura I. 13. b*). Al someter al hidrolizado con alcalasa a los cambios de pH (*Halc c*) se produjo una disminución en las áreas de todos los picos. Y, por último, luego de la digestión gastrointestinal simulada (*HalcDIG*) aparecieron moléculas con masas menores de 0,55 kDa (*Figura I. 13. c*).

Finalmente, al comparar *AisDIG* y *HalcDIG*, la principal diferencia observada se encuentra en la fracción que eluye entre los 20 y 23 ml (masas moleculares menores a 1 kDa), *Figura I. 13. d*, lo cual podría estar relacionado con una mayor proporción de moléculas totales en este rango de masas moleculares, así como también una mayor presencia de moléculas conteniendo aminoácidos aromáticos responsables de la absorción a 280 nm. También puede evidenciarse que en *AisDIG* permanece una baja proporción de moléculas con masas moleculares mayores a 6,5 kDa, mientras que esto no se observa en *HalcDIG*, lo cual se correlacionaría con el mayor grado de hidrólisis de esta última muestra. Es importante remarcar también, que en los dos digeridos aparece un pico al final de la corrida, correspondiente a masas moleculares muy pequeñas, esto es menores a las masas de los aminoácidos libres, sugiriendo la liberación de componentes de naturaleza no proteica.

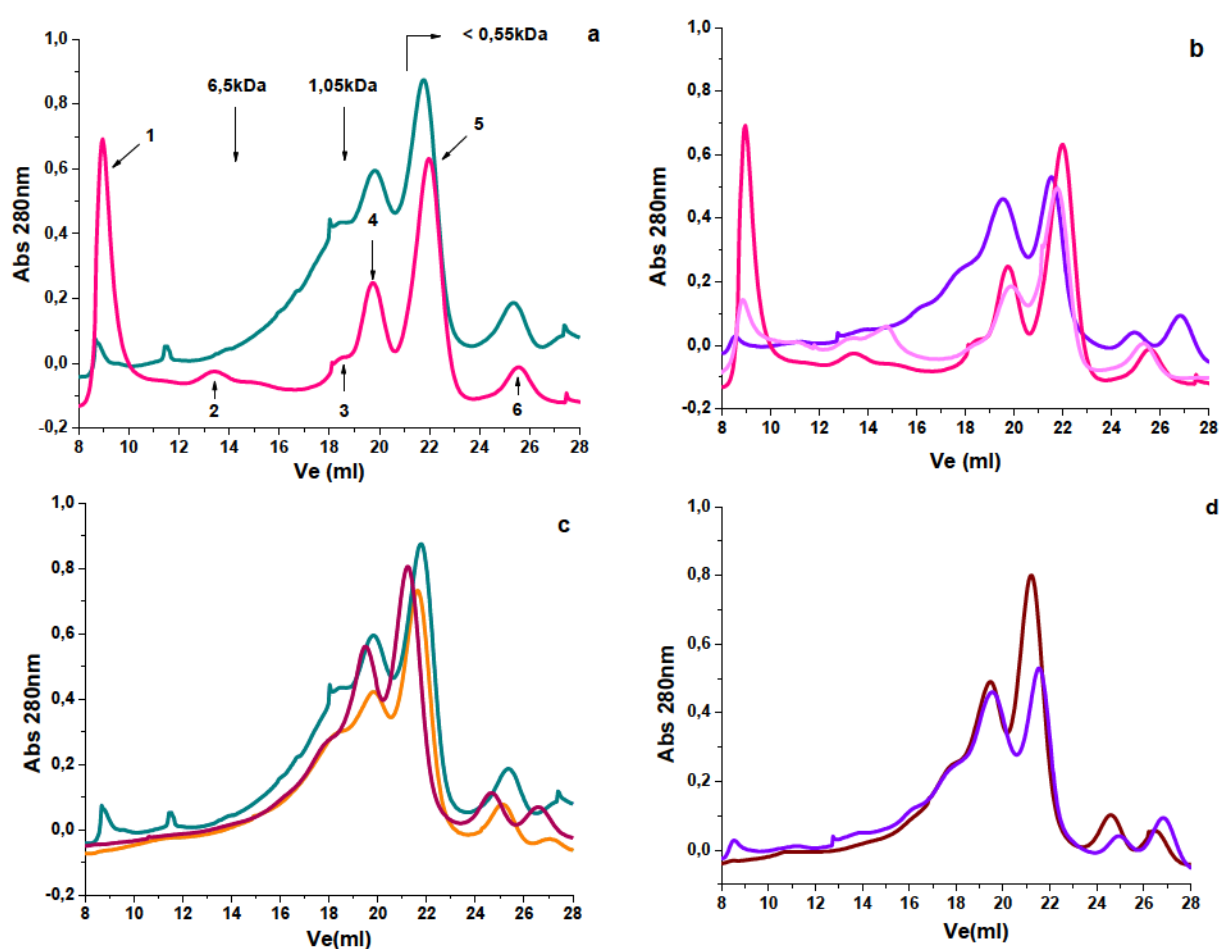
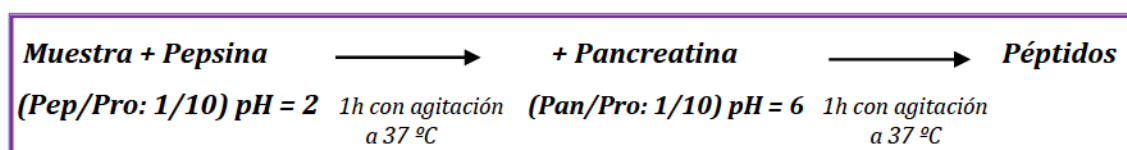


Figura I. 13.- Cromatogramas de exclusión molecular de las fracciones solubles, columna Superdex 30.
a) *Ais* – *Halc*; b) *Ais* – *Ais c* – *AisDIG*; c) *Halc* – *Halc c* – *HalcDIG*; d) *AisDIG* – *HalcDIG*

CONCLUSIONES

En esta primera etapa del trabajo, se logró establecer un protocolo para la simulación de la digestión gastrointestinal de las proteínas de amaranto obteniendo grados de hidrólisis que podrían reflejar lo que sucede dentro de nuestro organismo. El protocolo final de digestión establecido y aplicado tanto al aislado proteico como a su hidrolizado con alcalasa, obteniéndose las muestras *AisDIG* y *HalcDIG*, se muestra en el siguiente esquema:



El proceso de digestión gastrointestinal produjo un aumento de la capacidad antioxidante estimado a través de dos métodos experimentales diferentes, ABTS y ORAC. En trabajos previos se ha demostrado que los compuestos de naturaleza proteica que son capaces de ejercer actividad antioxidante por lo general son péptidos cortos, que poseen 2 a 20 aminoácidos (Chen y col., 1996; Peña-Ramos y col., 2004). Dichas características coinciden con el tamaño de los péptidos generados por la digestión gastrointestinal simulada.

Se ha demostrado que luego de la hidrólisis del aislado, ya sea por la acción de la alcalasa, de las enzimas gastrointestinales o de ambas, se observa una disminución o desaparición de las fracciones de mayor tamaño, fracciones de 65, 25,5 e incluso de 10 kDa, generándose péptidos de menor tamaño o aminoácidos libres. A partir de los estudios electroforéticos y de FPLC de exclusión molecular, se observó para todos los hidrolizados una importante aparición de moléculas con masas moleculares en el rango entre 6,5 kDa (\approx 59 aminoácidos) y aminoácidos libres, siendo especialmente notable la fracción de moléculas con masas cercanas a 1 kDa (\approx 9 aminoácidos). Además, por RP-HPLC, pudo observarse el ataque por parte de las enzimas a moléculas de carácter hidrofóbico, generándose especies más hidrofílicas. Todos los ensayos de caracterización molecular de las muestras realizados, presentaron sólo pequeñas diferencias entre ambos digeridos, siendo las más notables una mayor presencia de moléculas con masas moleculares menores a 1 kDa y menor presencia de moléculas con masas mayores a 6,5 kDa en *HalcDIG* respecto de *AisDIG*.

Por otra parte, también se estarían generando por la digestión gastrointestinal moléculas con absorbancia a 280 nm con masas menores a las de un aminoácido libre.

Es importante remarcar que no puede descartarse la posibilidad de que en los digeridos se encuentren presentes moléculas de naturaleza no proteica que pudieran aportar a la actividad antioxidante de los mismos, entre ellas compuestos fenólicos. Los pseudocereales, así como los cereales, pueden contener una variedad de compuestos fenólicos, los cuales pueden encontrarse en forma libre o ligados a otros componentes. Pueden formar uniones ésteres o éteres por reacción de sus grupos carboxilos o hidroxilos, respectivamente. Además, pueden unirse a proteínas en medios acuosos mediante distintos mecanismos tales como puente de hidrógeno, uniones covalentes, interacciones hidrofóbicas e iónicas. Dichos componentes pueden sufrir oxidaciones enzimáticas y no enzimáticas produciendo quinonas, las cuales pueden reaccionar con proteínas produciendo una coloración oscura en el producto (Liyana-Pathirana y Shahidi, 2006). Se ha reportado que la harina de amaranto contiene polifenoles (flavonoides) con actividad antioxidante interesante (Gorinstein y col., 2007). Barba de la Rosa y col. (2009) pudieron identificar y cuantificar ácidos fenólicos solubles tales como ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzoico y ácido siríngico así como tres polifenoles unidos a azúcares (rutina, isoquercitina y nicotiflorina) en harinas de *Amaranthus hypocondriacus*. Análisis preliminares realizados por nuestro grupo indican que los aislados proteicos de *A. mantegazzianus* contienen rutina, isoquercitina y nicotiflorina así como también los ácidos vanílico, 4-hidroxibenzoico, cumárico y salicílico, los cuales constituirían en conjunto una cantidad menor a 0,01 % p/p del aislado (datos no publicados). No se cuenta con datos, hasta el momento, sobre la forma en que se encuentran estos compuestos (libre o interaccionando con proteínas) así como tampoco sobre el efecto de la digestión gastrointestinal sobre los mismos, siendo posible una liberación durante dicho proceso.

Estos resultados preliminares evidencian una potencial generación de péptidos antioxidantes que podría ocurrir in vivo luego de la ingestión y digestión de proteínas/péptidos de amaranto, dando el sustento para profundizar el estudio de los digeridos gastrointestinales obtenidos.

CAPITULO II

*Evaluación de la capacidad antioxidante
de proteínas y péptidos de amaranto
frente a diversas especies reactivas.*

Si bien el oxígeno es fundamental para el desarrollo de la vida, su presencia también se encuentra asociada a la generación, incluso bajo condiciones fisiológicas, de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) (*Tabla II. 1*), las cuales resultan responsables del daño oxidativo de muchas macromoléculas biológicas (Halliwell y Gutteridge, 1999) y se encuentran involucradas en muchas situaciones patológicas (mutación, cáncer, enfermedades degenerativas, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento, entre otras) (Kohen y Niska, 2002).

Tabla II.1.- Principales especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS).

(Halliwell y Whiteman, 2004)

Radicales		No radicales	
Hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	Peróxidos orgánicos	ROOH
Alcoxilo	$\text{RO}\cdot$	Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$
Hidroperoxilo	$\text{HOO}\cdot$	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Superóxido	$\text{O}_2^{\cdot-}$	Ácido hipocloroso	HClO
Peroxilo	$\text{ROO}\cdot$	Ácido nitroso	HNO_2
Óxido nítrico	$\text{NO}\cdot$	Catión nitrilo	NO_2^+
Dióxido de nitrógeno	$\text{NO}_2\cdot$	Peroxinitrito	$\text{ONOO}\cdot$
		Ácido peroxinitroso	ONOOH
		Alquil peroxinitritos	ROONO
		Ozono	O_3

Algunas especies radicales presentan una vida media extremadamente corta y pueden reaccionar rápidamente con otras moléculas cercanas, mientras que cuando la vida media es más larga, tienen la posibilidad de difundir hacia diferentes compartimentos celulares y reaccionar con sustancias presentes en dichos sitios (*Tabla II. 2*).

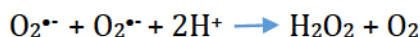
El radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) tiene una vida media muy corta (10^{-9} segundos) y una reactividad muy elevada (Bielski y Cabelli, 1995; Halliwell y Gutteridge, 1999). Dicha vida media hace que el radical reaccione sólo con moléculas que lo rodean, causando daño en el mismo lugar donde se generó, sin tener tiempo suficiente para trasladarse hacia otros sitios de

acción. El radical hidroxilo es un agente oxidante poderoso, considerado el más reactivo en los sistemas biológicos, que puede actuar con la mayoría de las moléculas orgánicas e inorgánicas de las células incluyendo varias enzimas, el ADN, las proteínas, los lípidos, aminoácidos, azúcares y ciertos metales. Las tres reacciones principales de los radicales hidroxilo incluyen reacciones de adición, de abstracción de protones y de transferencia de electrones (Halliwell y Gutteridge, 1999).

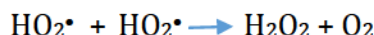
Tabla II. 2.- Vida media de algunos radicales (Reiter y col., 1995)

Radical	Vida media	Blanco biológico típico
$O_2^{\cdot-}$	10^{-5} s	Enzimas
H_2O_2	Estable	PUFA**
HO^{\cdot}	10^{-9} s	Todas las moléculas
R^{\cdot}	10^{-8} s	Oxígeno
RO^{\cdot}	10^{-6} s	PUFA
ROO_2^{\cdot}	7 s	PUFA
$ROOH^{\cdot}$		PUFA
1O_2	10^{-6} s	H^2O
$HOCL$	Estable	Varios
NO^{\cdot}	-1s	Varios

El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es generado por reducción enzimática de un electrón del oxígeno a través de la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa, o por una reacción incompleta de la cadena respiratoria. Se ha estimado que entre el 1 y 3 % del oxígeno que utilizamos es convertido a $O_2^{\cdot-}$ (Diplock y col., 1998). Esta especie se encuentra implicada en ciertas reacciones de iniciación de la oxidación, asociadas con el envejecimiento celular (Cotelle y col., 1996) dado que juega un rol importante en las reacciones de formación de otras ROS como el oxígeno singulete, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, los cuales se encuentran involucrados en el daño del ADN, lípidos y proteínas (Aurand, 1977; Pietta, 2000). Dicho anión presenta distintas propiedades dependiendo del pH y del entorno. A bajos pHs se encuentra como radical hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}) (Halliwell y Gutteridge, 1999; Seiler y col., 2001) que puede penetrar más fácilmente en las membranas biológicas. Es poco reactivo frente a especies no radicalarias en solución acuosa. Sin embargo, reacciona rápidamente con otros radicales como el óxido nítrico, ciertos clusters hierro/azufre en algunas enzimas y radicales fenoxilo. La rápida desaparición del radical superóxido en soluciones acuosas se debe a la reacción de dismutación, donde es oxidado a O_2 y reducido a H_2O_2 (Bielski y col., 1985; Schafer y Buettner, 2001).



Dado que es muy poco probable que las cuatro moléculas implicadas en la reacción anterior (2 de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y 2 H^+) choquen simultáneamente en solución, la constante de dicha reacción es muy pequeña, cercana a cero. La reacción que en general ocurre es también una reacción de dismutación pero luego de la protonación del radical superóxido.

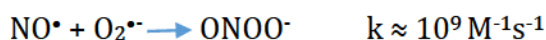


Por lo tanto, dicha reacción ocurrirá a pH ácido necesario para la protonación del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$. A medida que el pH se va haciendo más alcalino, la reacción ocurrirá a una velocidad menor, dado que la concentración de HO_2^{\bullet} en equilibrio con una concentración dada de $\text{O}_2^{\bullet-}$ disminuirá. En un entorno hidrofílico ambos radicales ($\text{O}_2^{\bullet-}$ y HO_2^{\bullet}) pueden actuar como agentes reductores, aunque la capacidad reductora del radical hidroperoxilo es mayor. En solventes orgánicos, la solubilidad del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ es mayor y, por lo tanto, su habilidad para actuar como agente reductor también lo es. Este radical actúa también como un nucleófilo potente, capaz de atacar centros cargados positivamente y como agente oxidante puede reaccionar con compuestos donantes de protones (Bielski y Cabelli, 1995).

Los radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), tienen una vida media relativamente larga, de aproximadamente 7 segundos, por lo que son capaces de difundir a distintos compartimentos en los sistemas biológicos. Pueden generarse en el proceso de peroxidación lipídica, el cual es iniciado por la abstracción de un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), siendo el radical hidroxilo capaz de iniciar esta secuencia de reacciones (Esterbauer y col., 1992; Reaven y Witzum, 1996). Otros productos generados durante la peroxidación lipídica son los radicales alcóxilo ($\text{RO}\cdot$) y los hidroperóxidos orgánicos (ROOH). Estos últimos pueden sufrir ciertos rearrreglos para producir endoperóxidos intermediarios que pueden luego ser escindidos para formar aldehídos. La reacción de los aldehídos con los grupos amino de las proteínas ha sido postulado como uno de los mecanismos involucrados en la modificación de las proteínas que forman parte de las lipoproteínas (Diplock y col., 1998).

El radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) se forma a partir de la L-arginina, por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), generándose L-citrulina además del óxido nítrico. Este radical puede reaccionar con una amplia variedad de radicales y sustancias, con una vida media que

dependerá de su concentración. Una de las reacciones más importantes, en condiciones fisiológicas en la que participa este radical, es la reacción con el radical superóxido generando peroxinitrito:



Dicha reacción es biológicamente significativa, al menos por dos razones. En primer lugar, al reaccionar el óxido nítrico (NO^\bullet) con el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) se produce un efecto antagónico sobre sus efectos biológicos. Recordemos que el óxido nítrico se encuentra implicado en varios procesos fisiológicos como el control de la presión sanguínea, la inhibición de la agregación plaquetaria, la neurotransmisión y la regulación de ciertas funciones gastrointestinales, entre otras (Halliwell y Gutteridge, 1999). En segundo lugar, dicha reacción es importante dado que el peroxinitrito en medio ácido se protona fácilmente y su forma protonada (ONOOH) es un compuesto oxidante citotóxico poderoso. Al adicionar ONOO^\bullet a cultivos celulares, tejidos o fluidos corporales, éste inmediatamente se protona y es capaz de producir la depleción de grupos $-\text{SH}$, la oxidación de lípidos, la rotura de la cadena de ADN, la nitración y deamidación de bases del ADN y la nitración de residuos de aminoácidos aromáticos en proteínas; causando un daño similar al que ocurre cuando el OH^\bullet está involucrado. Bajo condiciones fisiológicas el ONOOH puede reaccionar con otros componentes presentes en altas concentraciones, como el H_2O_2 o el CO_2 , para formar aductos que van a ser responsables de varios efectos deletéreos observados en sitios biológicos (Beckman y Koppenol, 1996; Czapski y Goldstein, 1995; Patel y col., 2000).

Evaluación de la actividad antioxidante.

Como ya ha sido mencionado, las reacciones de oxidación incluyen etapas de iniciación, propagación y terminación. Todo el proceso ocurre a través de reacciones en cadena que se van desarrollando a través de la formación de radicales libres. Las sustancias antioxidantes, por lo tanto, se suelen clasificar en dos grandes grupos: aquellas que inhiben o retardan la formación de radicales libres a partir de su precursor inestable, es decir, que inhiben el proceso de iniciación, denominados antioxidantes “preventivos” o antioxidantes secundarios; y aquellos que interrumpen la reacción radicalaria en cadena, es decir, la propagación, y se suelen denominar antioxidantes “chain-breaking”, “interruptores de la cadena de reacciones” o antioxidantes primarios.

El creciente interés por los posibles efectos beneficiosos de los antioxidantes ha llevado al desarrollo de una gran cantidad de métodos para determinar la capacidad/actividad antioxidante de una amplia variedad de compuestos, entre ellos, compuestos de origen alimentario. Es por eso que, luego de varios años de estudio, se ha logrado plantear un conjunto de condiciones que debería reunir un procedimiento estandarizado de medida de la capacidad antioxidante *in vitro* (Frankel y Meyer, 2000; Prior y col., 2005), entre ellas:

- Evaluar reacciones de transferencia de electrones y de átomos de hidrógeno.
- Especificar el sustrato de oxidación.
- Medir reacciones químicas donde el sustrato y el modo de inducir la oxidación sean relevantes como fuentes de daño oxidativo.
- Ser relativamente sencillos.
- Tener un mecanismo y un punto final definidos.
- Tener una buena reproducibilidad.
- Ser adaptable para medir antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.
- Usar distintas fuentes de radicales.
- Ser adaptable para análisis rutinarios a gran escala.
- Requerir instrumentación relativamente accesible.

Sin embargo, la realidad es que aún no existe ningún método que reúna tales características y es difícil que pueda evaluarse la capacidad antioxidante *in vitro* de una muestra por un solo método, por lo cual actualmente se considera adecuado utilizar una combinación de varios ensayos (Frankel y Meyer, 2000; Sanchez-Moreno, 2002; Aruoma, 2003; Prior y col., 2005). Esto se debe a varias razones: en primer lugar, como ya se ha mencionado anteriormente, los antioxidantes pueden ejercer su acción mediante mecanismos muy diversos (pueden suprimir la generación de los primeros radicales que inician el daño oxidativo, capturar radicales libres, quelar metales, formar complejos, reducir algunos compuestos, inducir la actividad de sistemas biológicos antioxidantes). Por otra parte, en un mismo sustrato pueden coexistir diferentes compuestos, pro-oxidantes, antioxidantes con distintos mecanismos de acción entre los que, además, se pueden establecer reacciones sinérgicas o antagónicas, o compuestos neutros frente a la oxidación. Por ello, serán necesarios distintos análisis para poder considerar los posibles mecanismos de acción de todos los antioxidantes presentes en una matriz dada.

Por otro lado, existen otros factores que deben considerarse al determinar la capacidad antioxidante de muestras tan complejas como son los extractos de alimentos, tales como las propiedades coloidales del sustrato, el estado de oxidación y la localización del antioxidante en las distintas fases, la composición del sistema, el tipo de sustrato oxidable, el modo de provocar la oxidación, la naturaleza heterogénea y heterofásica del sistema, las interacciones con otros componentes, entre otros (Mantle y col., 1998; Yu y Ong, 1999; Frankel y Meyer, 2000). También es necesario tener en cuenta que muchos compuestos que son capaces de prevenir la oxidación lipídica no previenen la oxidación de las proteínas o el ADN, incluso a veces podrían potenciar dicha oxidación (Aruoma, 2003).

Otro aspecto a considerar en la determinación de capacidad antioxidante *in vitro* es que, debido a las múltiples modificaciones hechas en cada uno de los métodos existentes, muchas veces la comparación entre resultados, aun correspondiendo al mismo método de medida, se debe efectuar con precaución, ya que pueden haber existido cambios tanto en la manipulación, como en la temperatura del ensayo, en la variedad de la muestra o en sus condiciones de procesado, en el modo de combinar las muestras con los reactivos o en la metodología empleada en la extracción (Bompadre y col., 2004; Mukhopadhyay y col., 2006). Por último, se debe tener en cuenta el hecho de que, en la literatura, los resultados para un mismo método se expresan de múltiples formas, lo que también dificulta su comparación (Villaño y col., 2005).

Antecedentes de péptidos antioxidantes.

Diversos péptidos, derivados de la hidrólisis de proteínas animales o vegetales, han demostrado poseer efectos beneficiosos para la salud, incluyendo la actividad antioxidante. La extensión en la que posean dicha actividad dependerá de diversos factores entre los que se encuentran: la fuente proteica de la que provengan, la acción proteolítica a la que fueron sometidos, la extensión de la hidrólisis y las características de los péptidos liberados: estructura, tamaño molecular, composición aminoacídica e hidrofobicidad (Hartmann y Meisel, 2007; Sarmadi e Ismail, 2010).

En el CAPITULO I se ha demostrado que la actividad antioxidante, medida a través del secuestro del catión radical ABTS^{•+} y por el método ORAC, aumentaría luego de la digestión gastrointestinal simulada de las proteínas de amaranto. Dado nuestro interés por evaluar

proteínas y péptidos de amaranto como potenciales ingredientes funcionales, se decidió ampliar el estudio de las propiedades antioxidantes, enfrentando a las muestras (antes y después de la digestión gastrointestinal) a diversas especies reactivas de importancia fisiológica.

OBJETIVO GENERAL.

Analizar la capacidad antioxidante de proteínas y péptidos de amaranto frente a diversas especies reactivas de importancia fisiológica.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- » Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* frente a especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.
- » Analizar el efecto de la hidrólisis previa con alcalasa y de la digestión gastrointestinal simulada sobre el potencial antioxidante de las muestras.
- » Intentar dilucidar el mecanismo de acción antioxidante de las proteínas y/o péptidos de amaranto.

II. 1.- Muestras utilizadas.

Se analizó la actividad antioxidante del aislado proteico de amaranto (*Ais*) y de su hidrolizado con alcalasa (*Halc*) a través de diversas metodologías, así como también la actividad de sus correspondientes digeridos gastrointestinales (*AisDIG* y *HalcDIG*), obtenidos tal como se describió en el *Capítulo I*.

II. 2.- Método ORAC.

Procedimiento experimental.

En esta etapa del trabajo el método ORAC fue optimizado a partir de las condiciones descriptas en el *Capítulo I* para su realización completa en microplacas negras de 96 fosas. Se preparó una solución stock de fluoresceína 53,3 μM en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) y se mantuvo en la oscuridad a -80 °C. En el momento del ensayo, la misma se diluyó hasta una concentración de 53,3 nM y se preparó una solución 160 mM de AAPH en el mismo buffer. Se mezclaron 150 μl de la solución de fluoresceína con 25 μl de muestra, buffer fosfato (control negativo) o Trolox (concentraciones entre 6,25 y 75 μM) y 25 μl de AAPH, en placas negras de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C con agitación continua entre las lecturas, realizando lecturas de fluorescencia (λ_{exc} : 485 nm, λ_{em} : 535 nm) cada 1 minuto durante 45 minutos en un lector de microplacas (SYNERGY HT – SIAFRT, Biotek Instruments, Vermont, Estados Unidos). Se calculó el área bajo la curva (AUC) de la siguiente manera:

$$\text{AUC} = 0,5 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_{i-1}/f_0 + 0,5 f_i/f_0 \quad [\text{Ec. II. 1}]$$

donde f_i es la fluorescencia en un tiempo determinado y f_0 la fluorescencia inicial. Paralelamente se realizó un blanco sin la adición de AAPH, y se calculó el porcentaje de secuestro de los radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) a través de la *Ecuación II. 2*.

$$\% \text{ de Secuestro de } \text{ROO}\cdot = [(AUC_M - AUC_{CN}) / (AUC_B - AUC_{CN})] \times 100 \quad [\text{Ec. II. 2}]$$

donde M es la muestra, CN es el control negativo y B es el blanco. Se graficó este valor en función de la concentración proteica en la muestra, obteniéndose el parámetro IC₅₀ que corresponde a la concentración de proteína que es capaz de lograr un 50 % de neutralización de los radicales.

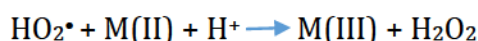
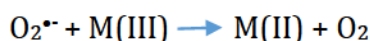
II. 3.- Método HORAC (Hydroxyl Radical Averting Capacity).

Fundamento.

A través de la reacción de Fenton, es posible generar diversas especies radicalarias, entre ellas, el radical hidroxilo (OH•). Esta reacción es reconocida como una de las reacciones más importantes en la explicación del daño oxidativo que ocurre en los sistema biológicos. La misma involucra varias especies oxidables capaces de reaccionar con diversos compuestos orgánicos, siendo el mecanismo más conocido el siguiente:



Además, otras reacciones son posibles a través del sistema de reacciones de Fenton:



La reacción o reacciones que predominen van a depender de las condiciones del entorno, especialmente del pH y de la relación de concentraciones H₂O₂/M(II), así como también del resto de las especies involucradas. Cualquier molécula orgánica puede ser ‘atacada’ por el radical hidroxilo, generando diversos radicales que pueden terminar desencadenando una cascada de reacciones, en la que muchas veces se encuentran involucradas reacciones de oxidación y de reducción de los iones hierro, cobre o cobalto, que son los metales divalentes más involucrados en estas reacciones (Halliwell y Gutteridge, 1992; Sutton y Winterbourn, 1989).

Las reacciones del OH^\bullet pueden clasificarse dentro de tres de los grupos ya mencionados anteriormente: reacciones en las que se encuentra involucrada la abstracción de un átomo de hidrógeno (HAT), reacciones de adición y de transferencia de electrones (SET). Estas reacciones ilustran un importante principio de la química radicalaria: la reacción de los radicales libres con especies no radicalarias genera distintos radicales libres. Estos nuevos radicales libres podrían presentar una reactividad menor, mayor o igual que los originales. Los radicales producidos por reacciones con OH^\bullet son generalmente menos reactivos, ya que el radical hidroxilo es una especie altamente reactiva.

A través de este método es posible medir la capacidad de inhibición de la formación de radicales hidroxilo (OH^\bullet) al exponer la muestra a un sistema generador de radicales hidroxilo, $\text{H}_2\text{O}_2/\text{M(II)}$, a través de la reacción de Fenton a 37°C , utilizando la fluoresceína como sonda fluorescente. De la misma manera que ocurre en el método ORAC, lo que se determina en este ensayo es la degradación oxidativa de la fluoresceína, que al reaccionar con los radicales hidroxilo generados se descompone formando, posiblemente, alguna de las diversas estructuras que se mostraron en la *Figura I. 4*, con la consiguiente pérdida de fluorescencia (Ou y col., 2001).

La pérdida de fluorescencia es, por lo tanto, un indicativo del daño que está sufriendo la fluoresceína por su reacción con radicales hidroxilo y sus derivados. Aquellos compuestos con capacidad antioxidante protegerán a dicha molécula de la degradación oxidativa, inhibiendo o disminuyendo la pérdida de fluorescencia. El efecto protector de los antioxidantes es medido, al igual que en el método ORAC, al calcular el área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia de la muestra comparada con el control negativo (CN) en el cual no hay antioxidantes presentes.

Procedimiento experimental.

Este método fue adaptado de los trabajos previos realizados por Ou y col. (2002) y Moore y col. (2006). Como se mencionó previamente, se generó el radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton, utilizando Co^{+2} y H_2O_2 , y se utilizó fluoresceína como sonda fluorescente. Se preparó una solución de fluoresceína $0,0603\ \mu\text{M}$ en buffer fosfato $35\ \text{mM}$ ($\text{pH} = 7,8$); una solución de H_2O_2 $0,75\ \text{M}$ en agua bidestilada y una solución de cobalto que se obtuvo disolviendo $10\ \text{mg}$ de ácido picolínico con $11\ \text{mg}$ de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en $50\ \text{ml}$ de agua bidestilada. Para llevar a cabo la reacción se mezclaron $20\ \mu\text{l}$ de las muestras o del buffer (control negativo) con $190\ \mu\text{l}$ de la solución de fluoresceína, $15\ \mu\text{l}$ de H_2O_2 y $75\ \mu\text{l}$ de la

solución de cobalto en placas negras de 96 pocillos (Greiner Bio-One). Luego se procedió a la agitación de la placa y a su incubación durante 3 horas en un lector de microplacas (SYNERGY HT-SIAFRT, Biotek), realizando medidas de fluorescencia (λ_{exc} : 485 nm, λ_{em} : 535 nm) cada 1 minuto, para obtener la curva de decaimiento de la fluorescencia y poder calcular la correspondiente área bajo la curva (AUC) resultante para cada dilución de cada muestra y de los controles (*Ecuación II. 1*). Paralelamente se realizó un blanco sin la adición de la solución de cobalto ni de peróxido de hidrógeno, y el porcentaje de inhibición de la formación de radicales hidroxilo fue calculado a través de la *Ecuación II. 3*.

$$\% \text{ de Inhibición de OH}^\bullet = [(AUC_M - AUC_{CN}) / (AUC_B - AUC_{CN})] \times 100 \quad [\text{Ec. II.3}]$$

donde M se refiere a la muestra, B al blanco y CN al control negativo en el cual se adicionó buffer en lugar de la muestra. Se graficó el % de inhibición respecto a la concentración proteica de la muestra, obteniéndose la concentración correspondiente a una inhibición del 50 % (IC₅₀). Como compuesto de referencia se utilizó el ácido clorogénico en concentraciones entre 0,05 y 0,5 mg/ml.

II. 4.- Secuestro del radical superóxido.

Fundamento.

El poder secuestrante de radicales superóxido se determinó utilizando un sistema no enzimático generador de radicales, constituido por metasulfato de fenazina y nicotinamida adenina dinucleótido (PMS/NADH). El radical O₂^{•-} se forma por la reacción entre el oxígeno atmosférico y el sistema PMS/NADH, y reduce al nitroazul de tetrazolio (NBT) amarillo para producir el formazán insoluble, negro azulado, que presenta absorbancia a 560 nm. Por lo tanto, si la densidad óptica de las muestras frente al control disminuye, será un indicativo de que los compuestos que se están estudiando poseen capacidad secuestrante del radical superóxido formado. En la *Figura II. 1* se puede observar la reducción del NBT causada por el radical, en la cual hay una adición de 4 electrones y 2 protones, formando el compuesto formazán insoluble.

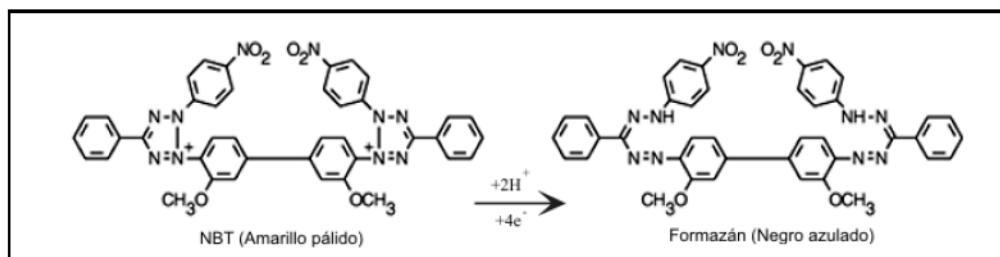


Figura II. 1.- Reducción del NBT causada por el radical superóxido.

Procedimiento experimental.

Este ensayo fue realizado a través de una adaptación del método utilizado por Hazra y col. (2008). Se prepararon las siguientes soluciones: NADH 150 μ M, NBT 100 μ M y PMS 30 μ M en agua bidestilada. Se mezclaron en una placa transparente de 96 pocillos de fondo plano 100 μ l de la solución de NADH con 100 μ l de NBT y 20 μ l de muestra, buffer (blanco) o sustancia de referencia, y, por último, se adicionaron 80 μ l de PMS. Luego de dos minutos de agitación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 560 nm en un lector de microplacas SYNERGY HT-SIAFRT. El porcentaje de secuestro del radical superóxido se calculó de la siguiente manera:

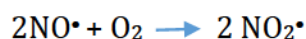
$$\% \text{ de Secuestro de } O_2\cdot^- = [(A_B - A_M) / A_B] \times 100 \quad [Ec. II. 4]$$

donde A_B es la absorbancia del blanco y A_M es la absorbancia de la muestra. Se graficó el porcentaje de secuestro del radical respecto a la concentración de la muestra para así poder calcular el IC_{50} . En este caso se utilizó ácido ascórbico como compuesto de referencia, con concentraciones entre 0,025 y 1 mM.

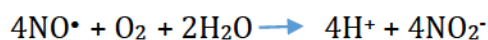
II. 5.- Secuestro del radical óxido nítrico.

Fundamento.

El óxido nítrico ($NO\cdot$) es un gas incoloro, moderadamente soluble en agua y mucho más soluble en solventes orgánicos. Su estudio es de gran importancia ya que se encuentra involucrado en muchas reacciones fisiológicas y patológicas. El $NO\cdot$ tiene un electrón desapareado por lo que es una molécula paramagnética y un radical libre. Al exponerlo al aire, reacciona con el O_2 y forma un gas de color marrón, el dióxido de nitrógeno ($NO_2\cdot$) que es mucho más reactivo que el propio $NO\cdot$.



En cambio, en solución acuosa, su oxidación produce el ion nitrito (NO_2^-):



El método más utilizado para la determinación del óxido nítrico es el ensayo de Griess, reacción colorimétrica a través de la cual se miden los productos finales de oxidación del mismo, es decir, los nitritos producidos. En este ensayo, los NO_2^- reaccionan con sulfanilamida en una solución ácida de N-(1-naftil) etilendiamina para dar como resultado un azoproducto coloreado, el cual se determina espectrofotométricamente.

Una de las formas más sencillas de generar el radical *in vitro* es a través de una disolución del nitroprusiato de sodio en una solución acuosa a pH fisiológico; de esta manera, se generará el radical espontáneamente (Hazra y col., 2008). Aquellos compuestos con capacidad secuestrante de NO^\bullet competirán con el O_2 , provocando una disminución de la producción de nitritos y, por lo tanto, una disminución de la absorbancia medida.

Procedimiento experimental.

Se realizó este ensayo mediante una adaptación de los métodos utilizados por Hazra y col. (2008) y Oliveira y Minotto (2010). En primera instancia, se generó el óxido nítrico (NO^\bullet) a través de la descomposición de una solución 200 mM de nitroprusiato de sodio (NPS) en buffer PBS (pH = 7,4). Las mezclas de reacción conteniendo 90 μl de las muestras, del buffer (blanco) o del compuesto de referencia y 10 μl de NPS se incubaron durante 150 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 100 μl del reactivo de Griess, determinando la concentración de nitritos a través de la medida de absorbancia de 540 nm en un detector de microplacas SYNERGY HT – SIAFRT. El porcentaje de secuestro del radical óxido nítrico se calculó a través de la *Ecuación II. 5*.

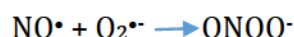
$\% \text{ de Secuestro de NO}^\bullet = [(A_B - A_M) / A_B] \times 100$	[Ec. II. 5]
--	-------------

donde: A_B es la absorbancia del blanco y A_M es la absorbancia de la muestra. Se graficó dicho porcentaje en función de la concentración de proteínas. Para este ensayo se utilizó como compuesto estándar ácido ascórbico en concentraciones entre 0,5 y 3 mg/ml.

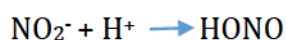
II. 6.- Secuestro del anión peroxinitrito.

Fundamento.

El óxido nítrico, los productos de oxidación del mismo y muchas especies reactivas del oxígeno se producen *in vivo* y se encuentran interactuando continuamente. El peroxinitrito, como se mencionó anteriormente, se forma al combinar el NO^\bullet con el anión radical superóxido, $\text{O}_2^{\bullet-}$, de la siguiente manera.



El anión peroxinitrito, ONOO^- , no es muy reactivo y soluciones del mismo en álcali son estables durante semanas si se mantienen congeladas. La síntesis de este compuesto se suele hacer a través de la reacción entre nitritos y H_2O_2 a bajos pH.



Inmediatamente después de ocurrida dicha reacción se estabiliza en la forma más estable y menos reactiva, ONOO^- , al añadir un exceso de NaOH. Estas soluciones alcalinas pueden ser estandarizadas al medir la absorbancia a 302 nm.

La actividad secuestrante del radical preformado se evaluó a través de la oxidación de la 2',7'-diclorofluorescina (DCFH), no fluorescente (*Figura II. 2*). Dicha sonda es oxidada rápidamente a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente por los peroxinitritos en una relación dosis dependiente, alcanzando un máximo de fluorescencia rápidamente. Si bien tanto H_2O_2 , NO^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet-}$ también son capaces de oxidarla, lo hacen a una velocidad mucho más baja, alcanzando valores de fluorescencia mucho menores (Possel y col., 1997).

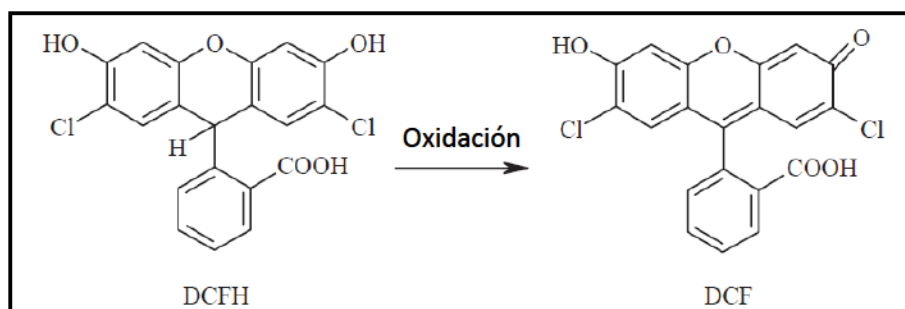


Figura II. 2.- Oxidación de la sonda DCFH (no fluorescente) a DCF (fluorescente).

Procedimiento experimental.

Se sintetizó peroxinitrito (ONOO^-) al mezclar NaNO_2 50 mM con H_2O_2 50 mM (volumen final 10 ml) en un baño de hielo y agregando 5 ml de solución de HCl 1 M. Luego de un segundo, se detuvo la reacción por adición de 5 ml de NaOH 1,5 M (Hughes y Nicklin, 1968). A fin de eliminar el H_2O_2 en exceso se agregaron 5 ml de MnO_2 0,6 M, previamente lavado con una solución de NaOH 3 M, y luego de 30 minutos de contacto a temperatura ambiente, se filtró la solución para poder separar el MnO_2 remanente insoluble. A continuación se midió la concentración de peroxinitrito formado a través de la medida de absorbancia a 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Fernandes y col., 2005).

La solución de DCFH utilizada fue obtenida mediante el tratamiento de 0,5 ml de 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) en etanol absoluto 1 mM con 2 ml de NaOH 0,1 M; luego de incubar dicha mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 7,5 ml de buffer fosfato 50 mM (90 mM NaCl , 5 mM KCl , adicionando inmediatamente antes del ensayo 100 μM de ácido dietiltri Aminopentaacético (DTPA)) ($\text{pH} = 7,4$), obteniendo una concentración final de DCFH de 50 μM (Possel y col., 1997). En placas de 96 pocillos se mezclaron 50 μl de DCFH 20 μM , 25 μl de peroxinitrito 200 nM (en NaOH 0,1 M) y 50 μl de las muestras, se incubaron durante 5 minutos a 37 °C y se leyó la fluorescencia (λ_{exc} : 485 nm, λ_{em} : 535 nm) en un detector de microplacas SYNERGY HT – SIAFRT (Kooy y col., 1997). El porcentaje de secuestro de radicales peroxinitrito se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Secuestro de } \text{NOO}^- = [(f_B - f_M) / f_B] \times 100 \quad [\text{Ec. II. 6}]$$

donde f_B es la fluorescencia del blanco y f_M es la fluorescencia de la muestra. Como en los casos anteriores, se graficó dicho porcentaje respecto a la concentración de proteínas. Para este ensayo, se utilizó ácido gálico como sustancia estándar (1-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

II. 7.- Resonancia de spin – electrón (ESR)

Fundamento.

La resonancia paramagnética electrónica (EPR) o espectroscopía de resonancia de espín electrónica (ESR) es una técnica que se utiliza para el estudio de materiales con electrones no apareados, siendo una metodología versátil y no destructiva. Los conceptos básicos de

EPR son análogos a los de la resonancia magnética nuclear, pero son los espines de los electrones los que se excitan en lugar de los espines de los núcleos atómicos. El estudio por EPR ofrece una gran especificidad, ya que los disolventes químicos ordinarios y las diversas matrices no dan lugar a espectros de EPR, sólo lo hacen aquellas sustancias que poseen electrones desapareados (Vidal, 1993).

Un electrón no apareado puede moverse entre dos niveles de energía, ya sea absorbiendo o emitiendo un fotón de energía de tal manera que se cumpla la condición de resonancia. Esto conduce a la ecuación fundamental de espectroscopia EPR:

$$\Delta E = h \cdot \nu$$

Experimentalmente, esta ecuación permite una gran combinación de frecuencias y valores de campo magnético, pero la gran mayoría de las mediciones de EPR se hacen con microondas en la región 9000-10000 MHz, con campos correspondientes a aproximadamente 3500 Gauss. Además, es posible generar espectros de EPR ya sea variando la frecuencia del fotón incidente en una muestra, mientras se mantiene la constante de campo magnético o a la inversa. En la práctica, por lo general es la frecuencia la que se mantiene fija. Una colección de centros paramagnéticos, tales como los radicales libres, estará expuesta a las microondas a una frecuencia fija.

Esta técnica ha surgido como una interesante herramienta, y en los últimos tiempos se ha incrementado tanto su desarrollo como su importancia para poder comprender mejor la cinética y los mecanismos de ciertas reacciones, tales como la lipoperoxidación, las reacciones de tipo Fenton y en reacciones *in vivo/in vitro* de tipo enzimáticas (Weil y Bolton, 2007).

Los radicales libres de mayor interés biológico, como ya hemos mencionado previamente, presentan tiempos de vida media muy cortos que van de los milisegundos a los nanosegundos, lo que imposibilita su correcta detección. Para solucionar este inconveniente, esta metodología involucra la reacción del radical libre con una molécula atrapadora de radicales, denominada atrapador de espín (Spin Trap), formando una especie radicalaria denominada aducto de espín (Spin Adduct), con una vida media considerablemente mayor a la del radical libre sin atrapar, es decir, más estable (*Figura II. 3*). Existen dos grandes familias de atrapadores de radicales libres: los nitrosocompuestos que se han dejado de utilizar por una serie de inconvenientes que presentaban y las nitronas. Estas últimas son bastante utilizadas para atrapar radicales libres, a pesar de que

las existentes en el mercado aún presentan ciertos problemas de solubilidad en medios acuosos, de selectividad y de biodisponibilidad. Existen dos grupos estructurales de nitronas en los cuales se ha centrado la mayor atención para el desarrollo de atrapadores de radicales libres, principalmente los compuestos aromáticos conjugados alcanos N-óxidos que incluyen la α -fenil-N-tert-butilnitrona (PBN) y los compuestos Δ^1 -pirrolina N-óxidos tales como la 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO)(Figura II. 4).

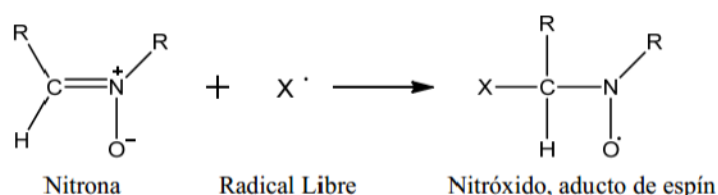


Figura II. 3.- Representación generalizada para la reacción entre una nitrona y un radical libre, formando un aducto de espín.

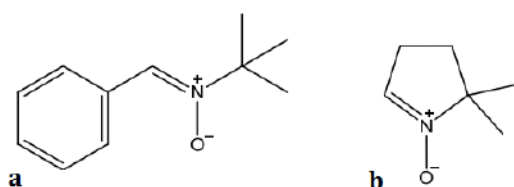


Figura II. 4.- Estructura de la α -fenil-N-tert-butilnitrona (PBN) (a) y del 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO) (b)

Las principales ventajas de la utilización de las nitronas es que son compuestos estables y como sólidos no son demasiado sensibles a la luz, oxígeno o vapor de agua; los aductos de espín de las nitronas son estables, lo cual es debido a que un átomo de carbono separa la función nitróxido del grupo que ha atrapado el radical. Entre sus principales desventajas encontramos que la información acerca de la naturaleza y estructura de los radicales atrapados es bastante difícil de obtener desde los espectros de los aductos de espín. Además, la fotólisis de las nitronas en algunos solventes produce rápidamente aductos de espín derivados de radicales del solvente; poseen baja selectividad como atrapadores de radicales libres y baja solubilidad en medios acuosos (Janzen, 1971).

Para la detección del aducto de espín mediante el uso de la resonancia de espín electrónico, la fuente más importante se deriva de los núcleos con momentos magnéticos en los átomos en la que reside el electrón no apareado. Por lo tanto, el campo magnético del núcleo sumará o restará del campo magnético externo impuesto una cantidad fija, en función de su

orientación. Este fenómeno provoca la división de la línea de absorción. La magnitud de la división de la línea de absorción dependerá del tamaño del momento nuclear magnético y de la fracción de la distribución electrónica sobre el átomo en particular. Estos desdoblamientos de líneas son importantes debido a que permiten la caracterización de la molécula paramagnética. Pequeñas diferencias entre radicales libres pueden causar con frecuencia significativos cambios en los espectros.

La absorción de la microonda ν por el sistema de espín puede ser observada si la frecuencia de la microonda satisface la condición de resonancia, que se representa a través de la siguiente expresión:

$$\Delta E = h * \nu = g * \mu_B * B_0$$

donde g es el denominado factor g y vale 2,0023 para el electrón libre, μ_B es el momento dipolar magnético para el magnetón de Bohr y vale $9,2741 \times 10^{-24}$ J/T y B_0 es el campo magnético externo. En el sistema de detección empleado en EPR, el espectro observado en el monitor corresponde a la primera derivada del espectro de absorción.

Un equipo EPR está constituido principalmente por una fuente de radiación electromagnética, una cavidad donde se coloca la muestra y un sistema de detección. La fuente de radiación electromagnética y el detector se hallan en un accesorio que se denomina "puente de microondas", que contiene al Klystron (oscilador electrónico) y al detector. La cavidad es una caja magnética donde se coloca la muestra que se sitúa entre los polos de un electroimán y en cuyo interior se va a producir la resonancia. En ella se va a almacenar la energía de microondas cuando se genera un patrón de ondas estacionarias en las que se procuran obtener máximos de campo magnético y mínimos de campo eléctrico, para asegurar la interacción del momento magnético de la muestra con el campo magnético externo de las microondas. El campo magnético estático externo que provocan los electroimanes debe ser perpendicular al campo magnético de las microondas para que pueda producirse absorción de las microondas por parte de la muestra. Una vez producida esta transición se manifiesta en una absorción de las microondas al interior de la cavidad. Finalmente, se dispone de un bloque de control que permite coordinar las diferentes unidades y registrar los datos de salida.

La fuente de microondas es generalmente el oscilador electrónico (Klystron) que proporciona una alta potencia de microondas, la cual no puede variarse fácilmente y para

conseguir dicho efecto se coloca un atenuador variable que permite ajustar con precisión la potencia de microondas que llega a la muestra. La mayoría de los equipos de EPR trabajan con microondas reflejadas, y no con las transmitidas, por lo cual es necesario que al detector sólo llegue la microonda que refleja la cavidad. Para conseguir este efecto se dispone de una válvula de sentido único (circulador) que impide que las microondas lleguen al detector sin pasar por la cavidad y, al mismo tiempo, que las ondas reflejadas por ésta vuelvan hacia el Klystron. Se utiliza como detector un diodo que trabaja en su zona “lineal” de funcionamiento (que es mayor o igual a corrientes de 200 μA). La detección de la señal se produce de la siguiente manera: la intensidad de campo magnético que la muestra percibe es una intensidad modulada sinusoidalmente a una determinada frecuencia (habitualmente 100 KHz). Esto se consigue sumando una componente alternante al campo estático; si la amplitud de modulación de campo es pequeña en comparación con la anchura de una línea resonante, la amplitud de la señal detectada será aproximadamente proporcional a la pendiente de la curva de absorción. El detector amplifica la señal modulada y la compara con una señal de referencia, filtrando todas las componentes que no presenten exactamente la misma frecuencia y fase que la modulación de campo empleada. De esta forma se eliminan gran parte de las interferencias eléctricas y ruido de fondo.

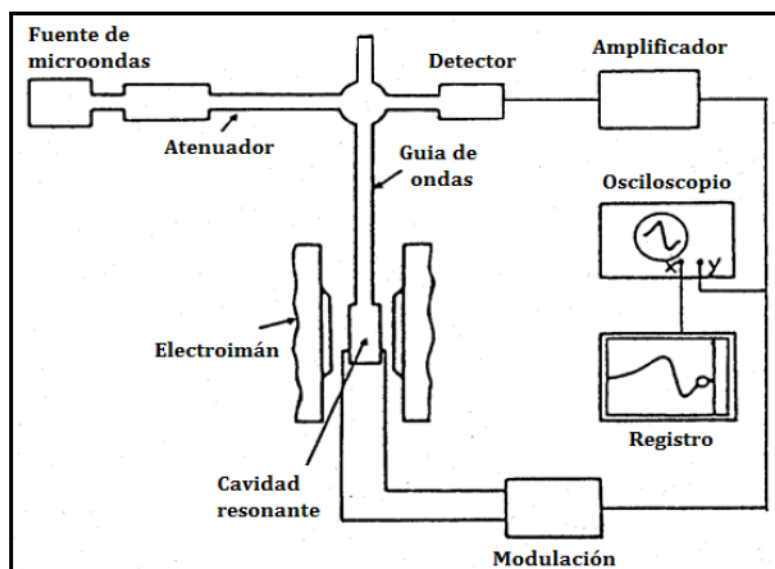


Figura II.5.- Esquema de funcionamiento de un equipo EPR.

Procedimiento experimental.

Se evaluó el secuestro de radicales derivados del AAPH y de radicales hidroxilo por EPR a temperatura ambiente utilizando un equipo Bruker BioSpin EMX Plus Spectrometer (Karlsruhe, Alemania).

Los *radicales derivados del AAPH* fueron “atrapados” con PBN. Se mezclaron 40 μl de PBN 50 mM disuelto en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8), con 40 μl de las muestras y 20 μl de AAPH 100 mM, y se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante 30 minutos. Una vez transcurrido dicho tiempo, las mezclas de reacción se transfirieron a pipetas Pasteur y se colocaron inmediatamente en el equipo para realizar la lectura. Las condiciones típicas de lectura en el equipo fueron: frecuencia de modulación 50 kHz; frecuencia de microondas 9,81 GHz; modulación de amplitud 1 G; potencia de microondas 20 mW; tiempo constante 82 ms; ancho de barrido 50 G; centro del campo 3515 G; número de escaneos 1.

La señal observada como resultado de la formación del aducto entre el radical derivado del AAPH y el PBN se muestra en la *Figura II. 6*. La intensidad de las señales se pudo cuantificar al determinar el promedio de la altura pico a pico de los dos primeros picos consecutivos, como se indica en la figura.

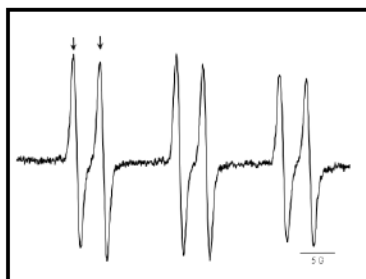


Figura II. 6.- Señal EPR del aducto formado entre el radical derivado del AAPH y el PBN.

Los *radicales hidroxilos* se generaron a través de la reacción de Fenton y se utilizó DMPO como atrapador de radicales. Se mezclaron 45 μl de las muestras en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8), 10 μl de DMPO 1 M, 25 μl de H_2O_2 1 mM, 10 μl de EDTA 1mM y 10 μl de FeSO_4 1 mM, y se transfirieron a una pipeta Pasteur, la cual se colocó en el equipo y se midió inmediatamente. Se utilizaron las condiciones típicas de lectura descritas anteriormente, excepto que la amplitud de modulación en este caso fue de 0.5 G; la constante de tiempo que fue de 655 ms; y el ancho de barrido que fue de 100 G.

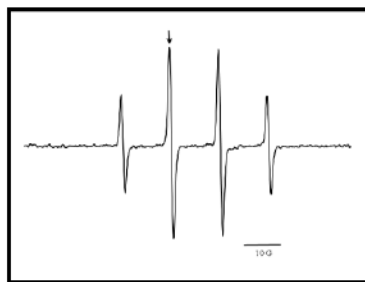


Figura II. 7.- Señal EPR del aducto formado entre el radical hidroxilo y el DMPO.

En este caso la intensidad de las señales se pudo cuantificar al determinar la altura pico a pico del primer pico grande que aparece, siempre después de un pico pequeño, como se indica en la *Figura II. 7.*

El porcentaje de secuestro de los radicales se calculó, en ambos casos, a través de la *Ecuación II.7.*

$$\% \text{ de Secuestro del radical} = [(S_B - S_M) / S_B] \times 100 \quad [\text{Ec. II.7}]$$

donde S_B es la señal correspondiente al blanco y S_M es la señal que corresponde a la muestra. Este parámetro se graficó en función de la concentración de proteínas. Para el caso de los radicales generados por el AAPH, se utilizó Trolox (10 - 250 μM) como sustancia de referencia y en el caso de los radicales hidroxilo se utilizó ácido clorogénico (0,125 - 1 mg/ml).

II. 8.- Análisis estadístico.

Para cada uno de los ensayos, las medidas fueron realizadas sobre una misma muestra, al menos por triplicado. El porcentaje de inhibición o de secuestro de radicales fue graficado en función de la concentración de proteínas en las muestras utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). En aquellos casos en los que no se pudo realizar un ajuste lineal de las curvas, se realizó un ajuste por regresión no lineal del tipo dosis-respuesta sigmoideo de pendiente variable, de acuerdo con la siguiente ecuación: $Y = \text{Valor mínimo} + (\text{Valor máximo} - \text{Valor mínimo}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) \cdot \text{pendiente}))}$, donde $X = \text{Log(concentración)}$, $Y = \% \text{ inhibición del radical}$. Para poder normalizar las curvas, el valor mínimo fue ajustado a un valor constante e igual a 0, mientras que el valor máximo se ajustó a un valor de 100. A partir de dichos ajustes se obtuvo el valor de la concentración de proteínas necesarias para lograr una inhibición del 50 % (IC_{50}).

II. 9.- Secuestro de radicales derivados del AAPH.

Como ha sido mencionado anteriormente, el proceso de peroxidación lipídica puede generar radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) a través de la abstracción de un átomo de H de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), seguida de la reacción con el oxígeno. Los radicales alcoxilos ($\text{RO}\cdot$) y los hidroperóxidos orgánicos (ROOH) también son productos de este proceso. Con el objetivo de evaluar la actividad de las proteínas y péptidos de amaranto frente a este tipo de radicales, se utilizó el AAPH para generarlos. Dicho compuesto, se descompone a 37 °C en tres especies posibles: radical alquilo ($\text{R}\cdot$), radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) y/o radical alcoxilo ($\text{RO}\cdot$), donde el R representa el grupo $\text{H}_2\text{N}(\text{HN})\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ (Nakajima y col., 2012).

Como se mencionó en el *Capítulo I*, a través del ensayo ORAC se puede medir la capacidad antioxidante debida a la interrupción de la cadena radicalaria, por neutralización de radicales $\text{ROO}\cdot$ mediante el mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno (Ou y col., 2001). Si bien en dicho *Capítulo* se presentaron determinaciones mediante el ensayo ORAC, en esta parte del trabajo el ensayo pudo ser optimizado para ser totalmente realizado en microplacas al contar con un equipo lector que permite la incubación a temperatura controlada y la agitación continua, además de la lectura de fluorescencia. De esta manera, se evaluaron distintas diluciones de las fracciones solubles de las muestras (1:50, 1:100, 1:250 y 1:500), expresando los resultados como el porcentaje de secuestro de radicales $\text{ROO}\cdot$ respecto a la concentración proteica, como se muestra en la *Figura II. 8. a*.

Luego de la hidrólisis del aislado (*Ais*) tanto con alcalasa como con las enzimas gastrointestinales se observó un aumento de la capacidad antioxidante. El valor del IC_{50} , calculado a partir del ajuste de la curva sigmoidea (*Figura II. 8. b*), disminuye alrededor de 5 veces luego de la hidrólisis con alcalasa (*Halc*) o con las enzimas gastrointestinales (*AisDIG*) (*Tabla II. 3*), lo cual indica el fuerte incremento ($p < 0.01$) del potencial antioxidante de los hidrolizados frente a los radicales peroxilo. Sin embargo, la digestión gastrointestinal del hidrolizado con alcalasa produce una pequeña disminución ($p < 0.01$) en su capacidad antioxidante por este método.

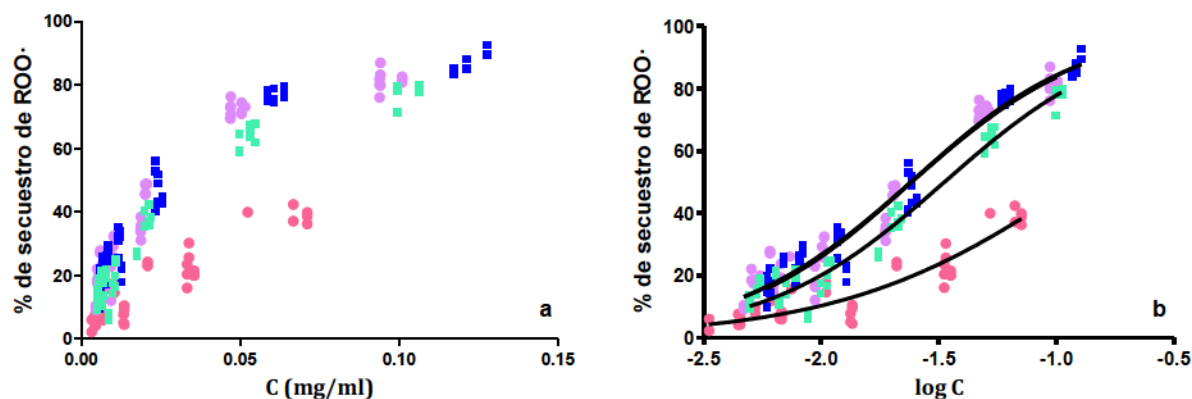


Figura II. 8. a.- Curvas dosis-respuesta para el ensayo ORAC.

b.- Curvas ORAC ajustadas a un comportamiento dosis-respuesta sigmoideo.

Ais (●), AisDIG (●), Halc (■) y HalcDIG (■).

La capacidad secuestrante de radicales peroxilo de otros hidrolizados proteicos ha sido demostrada a través de la utilización del método ORAC. Hidrolizados de caseína con alcalasa mostraron una actividad dependiente de la concentración y del pH, con valores de Trolox equivalente (TE) de 2 μM /20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para un hidrolizado a pH = 7 (Kim y col., 2007). En nuestro caso el valor correspondiente fue del orden de 20 μM /20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tanto para los hidrolizados con alcalasa como para los digeridos gastrointestinales, indicando un potencial antioxidante mayor en todos los casos. En otro trabajo, se demostró que hidrolizados con diversas enzimas de β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina alcanzaron valores de TE entre 1 y 2,9 μmol Trolox/mg de proteínas en el primer caso, y entre 0,7 y 2,1 μmol Trolox/mg proteínas en el segundo caso (Hernández-Ledesma y col., 2005); estos valores fueron comparables con los obtenidos en nuestro estudio (0,8 para *HalcDIG* y 1,2 para *AisDIG* y *Halc* μmol Trolox/mg proteínas). Samaranayaka y Li-Chan (2008) observaron valores ORAC de 225 ± 17 μmol TE/g de hidrolizado de proteínas de pescado liofilizadas, indicando una actividad mayor para estos hidrolizados comparados con otros valores ORAC encontrados para diferentes frutas como fresas, arándanos y frambuesas (150, 200 y 100 μmol Trolox equivalente/g materia seca, respectivamente). Diferentes hidrolizados obtenidos de aislado de proteínas de arroz han mostrado tener valores ORAC entre 34,2 y 87,3 μmol TE/g de materia seca, siendo sus valores comparables con aquellos de extractos vegetales (brócoli y zanahoria) analizados bajo las mismas condiciones (Zhou y col., 2013). En nuestro caso, los valores fueron mucho más altos debido a que, si tenemos en cuenta el contenido proteico de las muestras liofilizadas, los valores se encuentran en el

orden de 900 a 950 $\mu\text{mol TE/g}$ muestra liofilizada para *Halc* y *AisDIG*, y 600 $\mu\text{mol TE/g}$ de muestra liofilizada para *HalcDIG*.

Los estudios realizados mediante la técnica de EPR utilizando radicales derivados del AAPH, mostraron algunas diferencias respecto a los resultados obtenidos por ORAC. Como puede observarse en la *Figura II. 9. a.*, las curvas dosis-respuesta para *Ais* y *AisDIG* no presentaron diferencias tan notables como en el caso del ensayo ORAC (*Figura II. 8. a.*). De acuerdo con estos resultados, la digestión gastrointestinal del *Ais*, produciría sólo un disminución del 26 % en el valor del IC_{50} (*Figura II. 9. b* y *Tabla II. 3*). La hidrólisis con alcalasa tendría mayor efecto sobre *Ais*, presentado *Halc* el mayor potencial ($p < 0.01$), con un valor de IC_{50} 38 % menor que para *Ais*. Sin embargo, luego de la digestión gastrointestinal de *Halc*, se observó una disminución del potencial antioxidante, presentando *HalcDIG* valores de IC_{50} similares a los de *Ais* ($p > 0.01$) (*Tabla II. 3*).

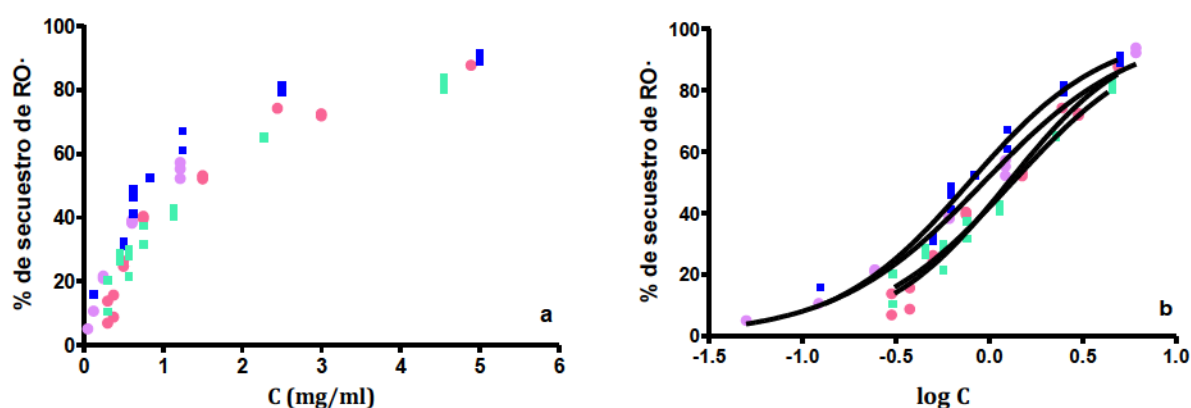


Figura II. 9. a.- Curvas dosis-respuesta para ensayos EPR evaluando radicales derivados del AAPH.

b.- Curvas de radicales del AAPH ajustadas a un comportamiento sigmoideo.

Ais (●), AisDIG (●), Halc (■) y HalcDIG (■).

Con las condiciones experimentales que se utilizaron, la señal obtenida (*Figura II.6 – Materiales y Métodos*) puede ser tentativamente asignada a un aducto formado entre un radical alcóxido y el PBN, de acuerdo con las constantes de “splitting” ($a_N = 15.5$ y $a_H = 3.7$ gauss) (Minetti y col., 1996; Nakajima y col., 2012). Este hecho podría ayudar a explicar las diferencias observadas entre los resultados obtenidos a través del ensayo ORAC y por EPR,

dado que en cada uno de los casos se estaría midiendo el secuestro de una especie radical diferente, peroxilos en el caso del ORAC y alcoxilos a través del EPR.

De acuerdo con los resultados obtenidos en ambos ensayos relacionados con radicales libres derivados del AAPH, podríamos concluir que los péptidos de amaranto liberados luego de la digestión gastrointestinal podrían tener una actividad importante frente a los radicales peroxilo pero mucho menor frente a los radicales alcoxilo.

*Tabla II. 3.-Valores de IC₅₀ para cada uno de los ensayos
utilizados para la evaluación de la actividad antioxidante.*

Muestra	ORAC IC ₅₀ (mg/ml)	EPR - RO· IC ₅₀ (mg/ml)	HORAC IC ₅₀ (mg/ml)	EPR - OH· IC ₅₀ (mg/ml)	Superóxido IC ₅₀ (mg/ml)	Óx. nítrico IC ₅₀ (mg/ml)	Peroxinitrito IC ₅₀ (mg/ml)
Ais	0,12 ^a (0,10-0,16)	1,26 ^a (1,12-1,42)	2,29 ^a (2,07-2,54)	4,02 ^a (3,33-4,86)	Nc	Nd	3,69 ^a (2,94-4,63)
AisDIG	0,024 ^b (0,023-0,026)	0,93 ^b (0,85-1,02)	0,97 ^b (0,82-1,14)	0,93 ^b (0,87-0,99)	Nc	2,85 ^a (2,32-3,49)	0,73 ^b (0,68-0,80)
Halc	0,024 ^b (0,023-0,026)	0,78 ^c (0,71-0,85)	1,29 ^{b,c} (1,09-1,52)	5,11 ^a (4,53-5,76)	Nc	3,75 ^a (2,57-5,48)	0,93 ^c (0,83-1,03)
HalcDIG	0,033 ^c (0,031-0,036)	1,33 ^a (1,21-1,46)	1,31 ^c (1,18-1,45)	2,20 ^c (1,84-2,63)	2,76 (2,39-3,18)	2,85 ^a (2,51-3,24)	1,02 ^c (0,93-1,12)
Ref.	0,007 ¹ (0,006-0,007)	0,019 ¹ (0,017-0,022)	0,27 ² (0,25-0,28)	0,53 ² (0,51-0,57)	0,10 ³ (0,09-0,11)	3,54 ³ (3,17-3,95)	0,015 ⁴ (0,013-0,017)

- Valores de IC₅₀ obtenidos de curvas dosis-respuesta ajustadas a comportamiento sigmoideo (GraphPad Prism 5.00)
- Entre paréntesis se muestra el intervalo de confianza (95 %) para cada caso.
- Diferentes letras en los superíndices de una misma columna, indican diferencias significativas entre las muestras (p < 0.01).
- Nc: valor no calculado debido a falta de ajuste de la curva.
- Nd: valor no determinado por problemas experimentales.
- Ref.: compuestos de referencia: ¹ Trolox, ² Ácido clorogénico, ³ Ácido ascórbico, ⁴ Ácido gálico

II. 10.- Efecto frente a radicales hidroxilo.

Los radicales hidroxilo son las especies más reactivas y pueden ser generadas *in vivo* por irradiación a través de la ruptura homolítica del agua o a través del H₂O₂ endógeno por procesos catalizados con metales (reacción de Fenton/Haber Weiss) (Diplock y col., 1998). El hidroxilo, como ya se mencionó anteriormente, es un agente oxidante muy poderoso, siendo sus principales reacciones químicas aquellas de abstracción de hidrógeno, reacciones de adición y de transferencia de electrones (Kohen y Nyska, 2002).

El ensayo HORAC, como ya se ha descrito en *Materiales y Métodos (Sección II. 3)*, es un ensayo fluorométrico que evalúa la capacidad de prevenir la formación de radicales hidroxilo (Ou y col., 2002). El mismo fue optimizado para ensayar nuestras muestras debido a que este método se ha utilizado previamente sólo para evaluar antioxidantes de naturaleza fenólica. Se obtuvieron curvas dosis-respuesta a través de la utilización de distintas diluciones de las fracciones solubles de cada muestra (diluciones 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:75 y 1:100) (*Figura II. 10. a*).

Aunque luego de la hidrólisis con alcalasa y de la digestión gastrointestinal simulada se observa un aumento en la actividad HORAC, el efecto de la hidrólisis no es tan importante como en el caso del ensayo ORAC. El *AisDIG* presentó valores de IC₅₀ 58 % menores que en el caso de *Ais*, mientras que la disminución para *Halc* y *HalcDIG* fue de 43 % (*Figura II. 10. b* y *Tabla II. 3*). También es importante remarcar, que aunque en los dos ensayos se utiliza la misma sonda fluorescente, las concentraciones que se evalúan son muy diferentes, permitiendo el ensayo ORAC evaluar concentraciones proteicas/peptídicas mucho más bajas.

En trabajos previos, Ou y col. (2002) demostraron que el ensayo HORAC reflejaría la capacidad de los antioxidantes de quelar metales, inhibiendo de esta manera la formación de radicales OH[•]; mientras que, como ya se mencionó anteriormente, el ensayo ORAC mide la capacidad de secuestro de radicales peroxilo. Por lo tanto, un antioxidante como el Trolox, que actúa a través de la interrupción de la cadena radicalaria, no presentaría actividad en un ensayo como el HORAC; este hecho fue corroborado en nuestro laboratorio durante la realización de ensayos preliminares de puesta a punto del método. En función de ello, se utilizó como compuesto de referencia un ácido fenólico, el ácido clorogénico. Ou y col. (2002) sugieren que los compuestos fenólicos actúan como quelantes por

coordinación del Co^{+2} y, por lo tanto, bloquean los sitios para el H_2O_2 , evitando la formación del radical hidroxilo.

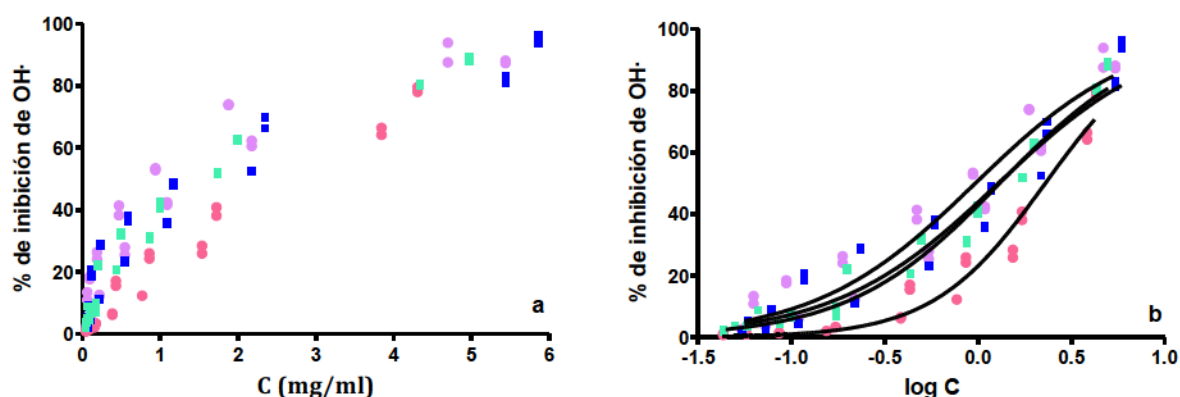


Figura II. 10. a.- Curvas dosis-respuesta correspondientes al ensayo HORAC.

b.- Curvas HORAC ajustadas a un comportamiento dosis-respuesta sigmoideo.

Ais (●), AisDIG (●), Halc (■) y HalcDIG (■).

Por otro lado, existen otras versiones para la determinación de la inhibición de radicales OH^\cdot utilizando fluoresceína como sonda; tal es el caso del ensayo HOSC (Hydroxyl Radical Scavenging Capacity) desarrollado por Moore y col. (2006). Este método utiliza una mezcla de $\text{Fe}^{+3}/\text{H}_2\text{O}_2$ para generar los OH^\cdot y evalúa la capacidad de neutralización de dichos radicales; el Trolox presenta actividad HOSC y este ensayo muestra una excelente correlación con el ensayo ORAC. Utilizando el método HOSC, Ma y col. (2010) demostraron el incremento de la actividad secuestrante de OH^\cdot de proteínas de trigo sarraceno luego de la digestión con pepsina y pancreatina. Estos autores postularon que, en este tipo de ensayos, la capacidad antioxidante puede ser expresada tanto como la inhibición de la formación del radical a través de la quelación de metales o por eliminación de los radicales ya formados; y, comparando este ensayo con la capacidad secuestrante del radical ABTS^{+} , concluyeron que la inhibición de la formación del radical probablemente no sería un factor determinante para medir la eficacia de los hidrolizados como antioxidantes.

En nuestro caso, los resultados sugieren que ambos tipos de hidrólisis realizadas sobre las proteínas de amaranto - alcalasa o enzimas gastrointestinales- serían capaces de liberar péptidos con capacidad de interrumpir la cadena radicalaria (medida mediante el ensayo ORAC), y en menor medida, péptidos con actividad quelante de metales (medida mediante el ensayo HORAC); siendo la digestión gastrointestinal más efectiva que la hidrólisis con

alcalasa. Además, se ha demostrado que una hidrólisis con alcalasa previa a la digestión gastrointestinal no tendría un efecto positivo adicional sobre estas actividades.

A fin de aportar más información sobre el comportamiento de las muestras frente a los radicales $\text{OH}\cdot$, se realizaron estudios por EPR utilizando una mezcla $\text{Fe}^{+2}/\text{EDTA}/\text{H}_2\text{O}_2$ como generadora de los $\text{OH}\cdot$. Se calculó el % de secuestro del radical tanto para el ácido clorogénico como para las muestras, obteniéndose las correspondientes curvas dosis-respuesta (*Figura II. 11. a*). Luego de la digestión gastrointestinal de *Ais*, el potencial antioxidante representado por el valor de IC_{50} aumentó más de cuatro veces (*AisDIG*) de acuerdo a este método (*Figura II. 11. b y Tabla II. 3*), siendo este incremento mucho mayor que al registrado por el método HORAC para el mismo radical. Mientras tanto, el hidrolizado con alcalasa presentó un potencial muy bajo, pero luego de la digestión gastrointestinal del mismo, dicho potencial aumentó aunque su actividad fue significativamente menor ($p < 0,01$) que aquella correspondiente al *AisDIG* (*Figura II. 11. b y Tabla II. 3*).

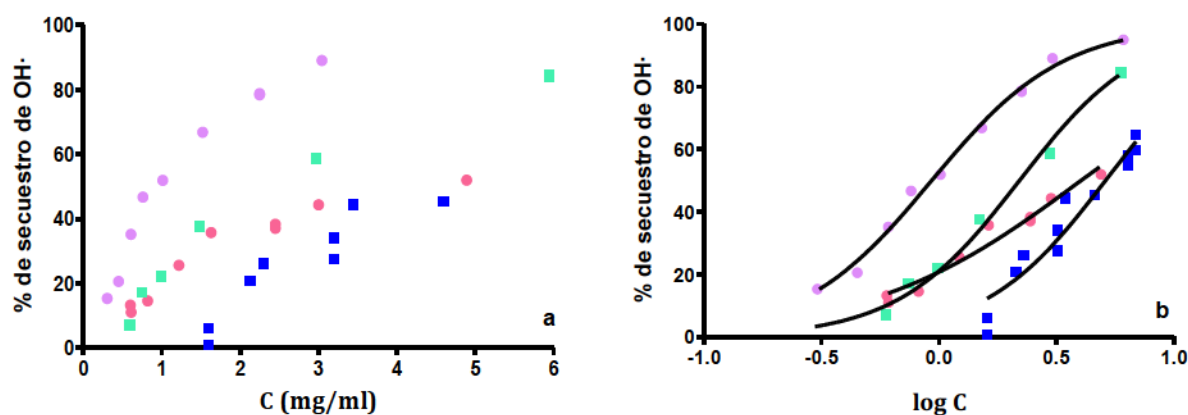


Figura II. 11. a.- Curvas dosis-respuesta para el ensayo EPR- $\text{OH}\cdot$

b.- Curvas EPR- $\text{OH}\cdot$ ajustadas a un comportamiento dosis-respuesta sigmoideo.

Ais (●), AisDIG (●), Halc (■) y HalcDIG (■).

La capacidad de inhibir la formación de radicales $\text{OH}\cdot$ medida por EPR, mostró un comportamiento muy diferente con los resultados obtenidos por HORAC para las mismas muestras. Dichas diferencias probablemente se encuentren relacionadas con el mecanismo de acción evaluado en cada uno de los casos. Como se mencionó anteriormente, a través del

método HORAC se evalúa la capacidad de una sustancia de quelar metales, inhibiendo la formación de los radicales OH^\cdot (Ou y col., 2002), mientras que en EPR, la disminución de la intensidad de la señal de los aductos DMPO-OH^\cdot generalmente está asociada al secuestro de estas especies radicales (Linxiang y col., 2007). De esta manera, a través de los ensayos de EPR se estaría evaluando la actividad secuestrante de radicales OH^\cdot por parte de las proteínas y péptidos de amaranto. En este sentido, *Ais* y *Halc* presentarían la menor capacidad secuestrante, siendo su actividad quelante más importante que la secuestrante. Por su parte, el *AisDIG* sería el que presentó las mejores características, tanto para inhibir la formación como para secuestrar los radicales OH^\cdot .

Mendis y col. (2005) demostraron que hidrolizados con tripsina de gelatina de piel de calamar fueron capaces de secuestrar radicales hidroxilo utilizando el método de EPR en una relación dosis dependiente, alcanzando cerca de un 70 % de secuestro con una concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, Zhong y col. (2011) estudiaron un hidrolizado de proteínas de carpa plateada con pepsina ($\text{GH} = 20\%$) y encontraron que era capaz de lograr una disminución importante de la señal de EPR correspondiente a los radicales OH^\cdot con una concentración de 2 mg/mL . Estos resultados son comparables con los que se obtuvieron en el presente trabajo, especialmente en el caso del *AisDIG*, que produciría un secuestro mayor al 70 % para concentraciones peptídicas cercanas a 2 mg/mL (*Figura II. 11. a*).

II. 11.- Secuestro de radicales superóxido.

El anión superóxido tiene un rol central en nuestro organismo, dado que participa en la generación de otras especies reactivas intermediarias. Como se mencionó anteriormente, tanto el superóxido (O_2^\cdot) como su forma ácida, el radical hidropéroxilo (HO_2^\cdot) pueden actuar como agentes reductores capaces, por ejemplo, de reducir el ion férrico (Fe^{+3}) a ferroso (Fe^{+2}). También actúan como nucleófilos, capaces de atacar centros cargados positivamente, y como agentes oxidantes pueden reaccionar con compuestos capaces de donar átomos de hidrógeno, por ejemplo, ascorbato o tocoferol. La reacción más importante del radical superóxido es su dismutación, donde un radical O_2^\cdot es oxidado a O_2 y el otro es reducido a H_2O_2 (Kohen y Nyska, 2002).

Como se mencionó en *Materiales y Métodos*, la actividad secuestrante de O_2^\cdot fue evaluada utilizando radicales generados a partir del oxígeno disuelto en una solución de PMS-NADH

y midiendo su habilidad para reducir NBT. La disminución de la absorbancia a 560 nm en presencia de una muestra refleja su habilidad para secuestrar radicales $O_2^{\cdot-}$ en la mezcla de reacción. En la *Figura II. 12. a* se muestra el % de secuestro de radicales $O_2^{\cdot-}$ en función de la concentración proteica de las fracciones solubles (diluciones 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 y 1:10). Las muestras *Ais* y *AisDIG* presentaron una baja capacidad secuestrante de estos radicales, alcanzando sólo un 25 y un 40 % de inhibición respectivamente, para concentraciones de 2 mg/ml, disminuyendo dicha capacidad para concentraciones mayores. *Halc* presentó un secuestro menor al 15 % para todas las concentraciones ensayadas (*Figura II. 12. a*). Por último, el comportamiento de *HalcDIG* pudo ser ajustado a un modelo de dosis-respuesta sigmoideo, siendo posible calcular el valor de IC_{50} para dicha muestra (*Figura II. 12. b* y *Tabla II. 3*). Los resultados sugieren que ni la hidrólisis con alcalasa ni la digestión gastrointestinal serían capaces de producir una mezcla de péptidos con una elevada capacidad de secuestrar radicales superóxido. Mientras que cuando ambos procesos fueron aplicados, el digerido resultante, *HalcDIG*, presentó una elevada actividad, especialmente evidente a altas concentraciones de péptidos.

Sin embargo, no se puede descartar que hayan ocurrido ciertos problemas experimentales por los cuales no fue posible apreciar el poder secuestrante de la mayoría de las muestras (*Ais*, *AisDIG* y *Halc*) para concentraciones por encima de los 2 mg/ml. Una posible explicación podría ser la formación de turbidez en la mezcla de reacción, la cual produciría el aumento de la densidad óptica, en contraposición al efecto esperado (recordemos que a mayor actividad antioxidante de la muestra menor es la absorbancia leída). Otra causa posible podría ser la presencia en las muestras de ciertas moléculas capaces de reducir directamente el NBT. Con el fin de evaluar estas posibilidades, se ensayaron sistemas control que contenían sólo las muestras y NBT, sin radicales $O_2^{\cdot-}$. Estos ensayos mostraron la formación de turbidez (visualmente apreciable) en las mezclas de NBT con *Ais* (concentraciones por encima de 1,5 mg/ml) así como con *Halc* (concentraciones por encima de 5 mg/ml), mientras que las muestras *AisDIG* y *HalcDIG* no presentaron turbidez para ninguna de las concentraciones ensayadas. Además, estos sistemas no presentaron un aumento en la absorbancia debido a la reacción de las muestras con NBT. Por lo tanto, ni la turbidez ni la reacción directa con el NBT explicarían la baja actividad que presentó el *AisDIG*. Las diferencias con el *HalcDIG* pueden deberse a su mayor grado de hidrólisis y a su diferente composición molecular.

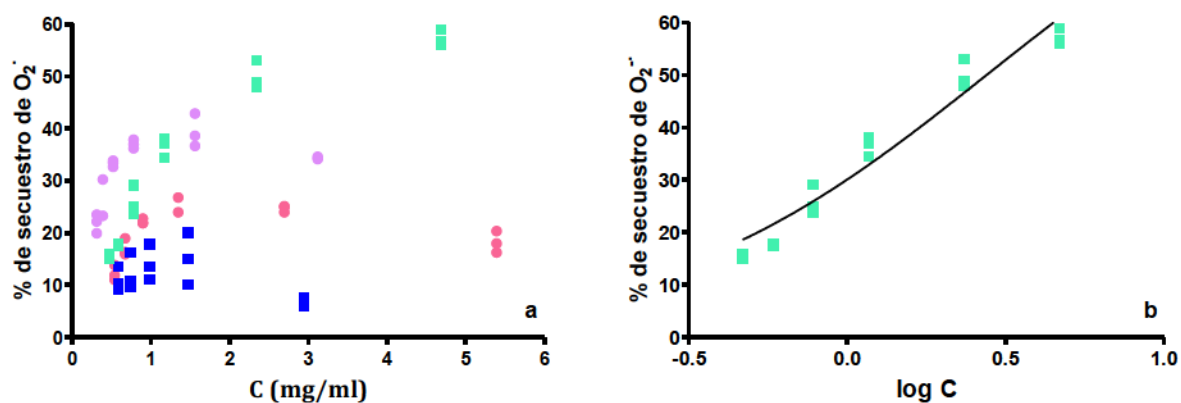


Figura II. 12. a.- Curva dosis-respuesta para el ensayo de secuestro de radicales superóxido.

b.- Curva de secuestro de $O_2^{\cdot-}$ ajustada a un comportamiento dosis-respuesta sigmoideo.

Ais (●), AisDIG (●), Halc (■) y HalcDIG (■)

La actividad secuestrante del radical superóxido ha sido previamente demostrada para péptidos provenientes de otras fuentes. Fracciones de hidrolizados de proteínas de soja con distintas masas moleculares mostraron presentar actividades entre 24,7 y 85,6 %, siendo su capacidad incrementada con la disminución de sus pesos moleculares (Moure y col., 2006). Péptidos de hojas de alfalfa obtenidos por hidrólisis con alcalasa y ultrafiltración (masas moleculares menores a 3 kDa) presentaron una actividad dependiente de la concentración (0-0,9 mg/ml), alcanzando un porcentaje de secuestro del radical del 67 % para 0,9 mg/ml (Xie y col., 2008). Digeridos gastrointestinales de proteínas de caupí (12,5 mg/ml) mostraron una capacidad de secuestro de superóxido de 16 % (Quansah y col., 2013). En nuestro caso, se logró una inhibición del 50 % para una concentración de 2,76 mg/ml de *HalcDIG* (Tabla II. 3), alcanzando una actividad máxima de cerca del 60 % con concentraciones cercanas a los 5 mg/ml (Figura II. 12. a). Cabe aclarar que el método utilizado en otros trabajos para medir el secuestro de los radicales superóxido fue el ensayo luminiscente del pirogalol (Xie y col., 2008; Quansah y col., 2013), por lo cual los resultados no son comparables.

II. 12.- Secuestro del óxido nítrico.

El óxido nítrico (NO^{\cdot}) es un compuesto involucrado en la señalización que, como ya fue mencionado, se forma enzimáticamente en nuestro organismo a partir de la arginina, y que, entre otras funciones, es el responsable de la relajación de los músculos lisos en las paredes

de los vasos sanguíneos, provocando una disminución de la presión sanguínea. También es producido por la activación de los macrófagos contribuyendo a la defensa primaria del sistema inmune. Sin embargo, un exceso de $\text{NO}\cdot$ resulta citotóxico debido a que puede reaccionar directamente con ciertas moléculas o combinarse con el $\text{O}_2\cdot$ para formar peroxinitrito (Diplock y col., 1998).

Para poder determinar el secuestro del óxido nítrico, fue necesario optimizar previamente las condiciones de ensayo, respecto a las proporciones de NPS, el reactivo de Griess y las muestras, de manera de poder evaluar la actividad de los péptidos. Luego de algunos ensayos preliminares, se pudo establecer el protocolo y se evaluaron distintas diluciones de las fracciones solubles (1:1, 1:2.5, 1:5 y 1:10).

En el caso del *Ais*, su actividad pudo ser medida para bajas concentraciones proteicas solamente, cerca de 0,3 mg/ml, lográndose sólo un 20 % de inhibición, debido a la aparición de turbidez en la mezcla de reacción, especialmente en concentraciones por encima de 1 mg/ml. Para poder tener en cuenta distintas interferencias, se ensayaron sistemas control en los que no se adicionó NPS, es decir, donde no había generación de $\text{NO}\cdot$, y se midió la absorbancia para cada una de las concentraciones de cada una de las muestras. En estas mezclas se observó la aparición de turbidez para diluciones de 1:1, 1:2.5 y 1:5 en el *Ais*, lo que también se observaba cuando la mezcla contenía NPS, mientras que en el caso de las muestras *Halc*, *AisDIG* y *HalcDIG*, sólo en las muestras sin diluir (1:1) se observó aumento de la absorbancia. Los valores de absorbancia que se obtuvieron en estos controles fueron sustraídos de las absorbancias de las mezclas de reacción con NPS de manera de poder calcular el % de secuestro del $\text{NO}\cdot$. Se obtuvieron curvas dosis-respuesta para las tres muestras hidrolizadas *Halc*, *AisDIG* y *HalcDIG* (Figura II. 13. a) y se calcularon los correspondientes valores de IC_{50} (Figura II. 13. b y Tabla II. 3). Como se puede observar en la Tabla II. 3 se obtuvieron elevados valores de IC_{50} para las tres muestras, estadísticamente similares ($p < 0,01$) entre ellos y con el correspondiente control, que en este caso fue el ácido ascórbico. Dados los inconvenientes metodológicos previamente descriptos, especialmente para la muestra *Ais*, no fue posible obtener una conclusión sobre el efecto de la hidrólisis sobre la capacidad de neutralización del radical $\text{NO}\cdot$.

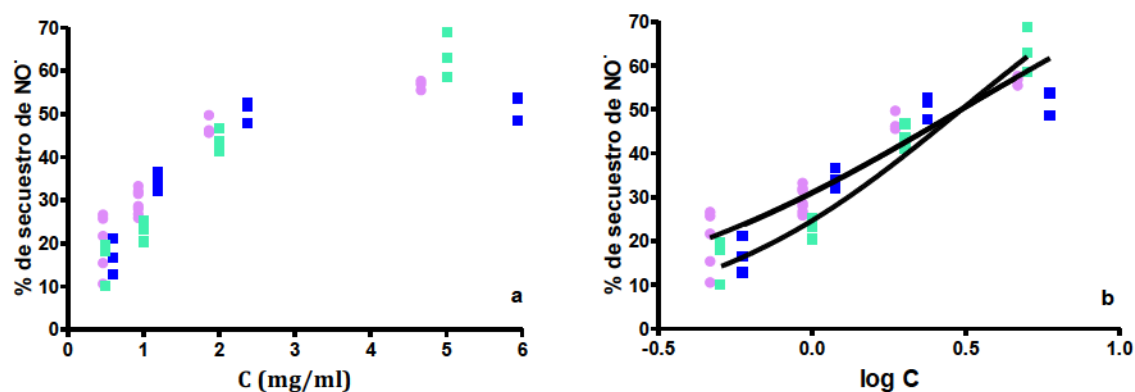


Figura II. 13. a.- Curvas dosis-respuesta para el ensayo de secuestro del óxido nítrico.

b.- Curvas de secuestro del NO^\bullet ajustadas a un comportamiento dosis-respuesta sigmoideo.

AisDIG (●), Halc (■) y HalcDIG (■)

En la literatura se encuentran muy pocas referencias acerca del secuestro del NO^\bullet por hidrolizados proteicos. Zhuang y Sun (2011) han demostrado la actividad secuestrante de una fracción con masa molecular menor a 2 kDa obtenida a partir de hidrolizados de gelatina, siendo su actividad dependiente de la concentración. A una concentración de 4 mg/ml, el secuestro que observaron fue del 79,3 %. Mientras que en nuestro caso, la actividad para una concentración similar, fue algo menor, cerca del 60 %. Si bien en dicho trabajo, los autores utilizaron el mismo método para generar el óxido nítrico, el método de medida de los mismos fue diferente al que utilizamos en el presente trabajo. Utilizaron una medida de absorbancia directa a 550 nm para contabilizar los nitritos, en lugar del reactivo de Griess, por lo que no serían totalmente comparables ambas metodologías (Figura II. 13. a).

II. 13.- Secuestro del anión peroxinitrito.

Una reacción importante en condiciones fisiológicas es la reacción entre el óxido nítrico y el superóxido resultando en la formación de peroxinitrito. Esta reacción ayuda a mantener el balance entre radicales superóxido y otras especies reactivas del oxígeno, y también es importante en la regulación redox. La forma protonada del peroxinitrito, ONOOH , es un potente agente oxidante que puede provocar la depleción de grupos sulfhidrilos y la oxidación de muchas moléculas, provocando daños similares a los del OH^\bullet . También es capaz de dañar el ADN a través de cortes, oxidación de proteínas o nitración de residuos

aromáticos en proteínas. Reacciona con otras especies como el H_2O_2 o CO_2 , formando aductos que podrían ser responsables de muchos efectos deletéreos en moléculas biológicas (Diplock y col., 1998; Kohen y Nyska, 2002).

La capacidad secuestrante de peroxinitrito fue evaluada utilizando una sonda no fluorescente, DCFH, la cual es oxidada por el peroxinitrito a la forma fluorescente DCF (Kooy y col., 1997; Possel y col., 1997). Distintas diluciones de las fracciones solubles de las muestras de amaranto (1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:15, 1:25 y 1:50) fueron evaluadas, obteniéndose las curvas dosis-respuesta que se muestran en la *Figura II. 14. a*. La actividad de todos los hidrolizados (*Halc*, *AisDIG* y *HalcDIG*) aumentó respecto a la del *Ais*. El *AisDIG* presentó el menor valor de IC_{50} ($p < 0,01$), siendo cerca de 5 veces menor que el correspondiente valor para *Ais* (*Figura II. 14. b* y *Tabla II. 3*). Mientras que *Halc* y *HalcDIG* no mostraron diferencias significativas entre ellas, siendo los valores de IC_{50} un poco mayores que para *AisDIG* ($p < 0,01$).

Así como se pudo observar en otros ensayos, una hidrólisis previa de las proteínas de amaranto con alcalasa no mejoraría la actividad antioxidante luego de la digestión gastrointestinal y además *AisDIG* presentó una potencia mayor que *HalcDIG*, lo cual podría estar relacionado con la diferente composición molecular de ambos digeridos, sugiriendo que el *AisDIG* sería el que presenta el mejor balance entre moléculas antioxidantes, pro-oxidantes e inactivas.

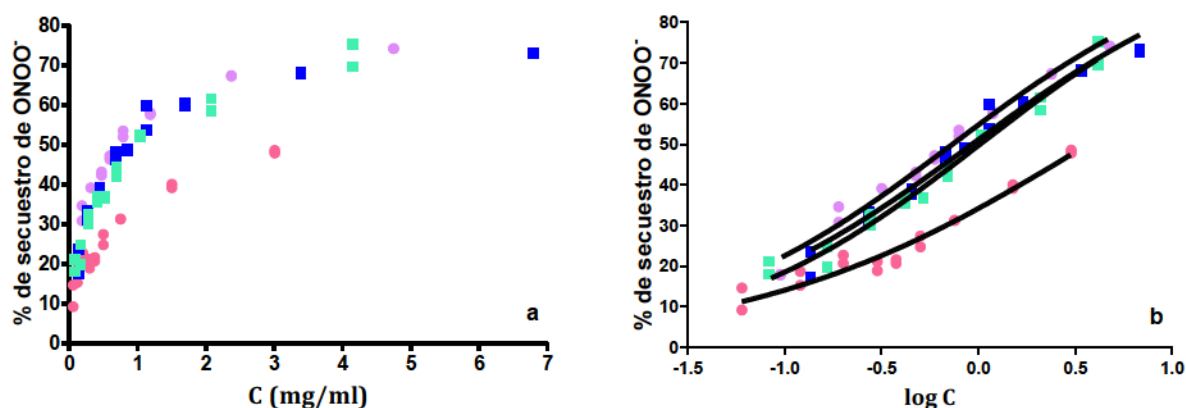


Figura II. 14. a.- Curvas dosis-respuesta para el ensayo de secuestro de peroxinitritos.

b.- Curvas de secuestro de ONOO^\bullet ajustadas a un comportamiento dosis-respuesta sigmoideo.

Ais (●), AisDIG (●), Halc (■) y HalcDIG (■).

En esta parte del trabajo se estudió, mediante una aproximación *in vitro*, la capacidad de los péptidos de amaranto generados por digestión gastrointestinal simulada de actuar frente a diversas especies reactivas presentes en nuestro organismo.

El hidrolizado que presentó mayor actividad fue el obtenido por digestión gastrointestinal del aislado proteico de amaranto, mientras que se demostró que una hidrólisis previa con alcalasa no mejoraría la capacidad antioxidante en ninguno de los casos ensayados, produciendo incluso un efecto negativo en algunos casos. La hidrólisis proteica produjo un importante aumento de la capacidad secuestrante de radicales peroxilo (ORAC), radicales hidroxilo (EPR-HO·) y peroxinitritos, en los que estarían involucrados mecanismos de donación de átomos de hidrógeno. Por otro lado, los péptidos liberados luego de la hidrólisis también podrían actuar como quelantes de metales (HORAC), aunque el aumento de esta actividad luego de la digestión no sería tan importante. Cabe aclarar que entre los métodos previamente mencionados, el ensayo ORAC fue el que permitió la evaluación de menores concentraciones proteicas/peptídicas, con valores de IC₅₀ en el orden de 3 a 4 veces menores.

Estos resultados han demostrado una prometedora capacidad de los péptidos de amaranto generados por digestión gastrointestinal simulada para prevenir el estrés oxidativo en el organismo humano. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los ensayos utilizados son ensayos in vitro que evalúan la neutralización directa de las especies reactivas. Por consiguiente, será necesario realizar a futuro ensayos que involucren cultivos celulares y ensayos in vivo para evaluar la acción de los péptidos de amaranto a nivel celular. En este sentido, ensayos preliminares con cultivos celulares indican cierto grado de protección frente a la oxidación de las células por ROS, siendo este efecto dependiente de la concentración proteica. También se debe tener presente que la real actividad que posean estos péptidos dentro del organismo va a depender de su capacidad de ser absorbidos a través de la mucosa intestinal y de poder llegar al sitio de acción correspondiente en cada caso en particular.

CAPITULO III

*Estudio de la absorción intestinal de
péptidos antioxidantes de amaranto.*

Si bien se ha demostrado que la digestión gastrointestinal de las proteínas de amaranto generaría péptidos con actividad antioxidante, para poder ejercer su actividad *in vivo* en sistemas u órganos internos del organismo, estos compuestos deben ser absorbidos a través del epitelio intestinal.

La absorción de nutrientes comienza en el estómago, sin embargo, la absorción allí es muy escasa, ya que dicho órgano no dispone de una membrana absorbente de tipo veloso y, además, las células de la mucosa se adhieren entre sí mediante uniones tan estrechas que no permiten el pasaje de casi ningún nutriente entre ellas. Sólo pequeñas cantidades de ciertas sustancias con elevada liposolubilidad y algunos fármacos son capaces de ser absorbidos en el estómago. En cambio, en la superficie absorbente de la mucosa del intestino delgado existen muchos pliegues denominados *válvulas conniventes*, que triplican la superficie de la mucosa absorbente. Dichos pliegues se extienden circularmente alrededor del intestino y se encuentran especialmente bien desarrollados en el duodeno y en el yeyuno, donde generalmente sobresalen incluso hasta 8 milímetros hacia la luz intestinal. Sobre la totalidad de la superficie del intestino delgado existen millones de pequeñas *vellosidades*, las cuales se encuentran tan próximas unas de otras, en la parte alta del intestino delgado, que se rozan entre sí. Si bien en las porciones más distales del intestino, el número de vellosidades va disminuyendo progresivamente, su presencia provoca un aumento del área de absorción de hasta diez veces más. Por último, cada célula epitelial de la vellosidad intestinal posee un 'borde en cepillo' formado por cerca de mil *microvellosidades* que sobresalen hacia la luz intestinal (*Figura III. 1*). El incremento de la superficie expuesta producida por las microvellosidades es de al menos veinte veces más. Por lo tanto, la combinación de las válvulas conniventes con las vellosidades y las microvellosidades determina un aumento del área absorbente de la mucosa de casi mil veces, por lo cual una gran proporción de la absorción de nutrientes ocurre en la zona alta del intestino (Johnson, 2002).

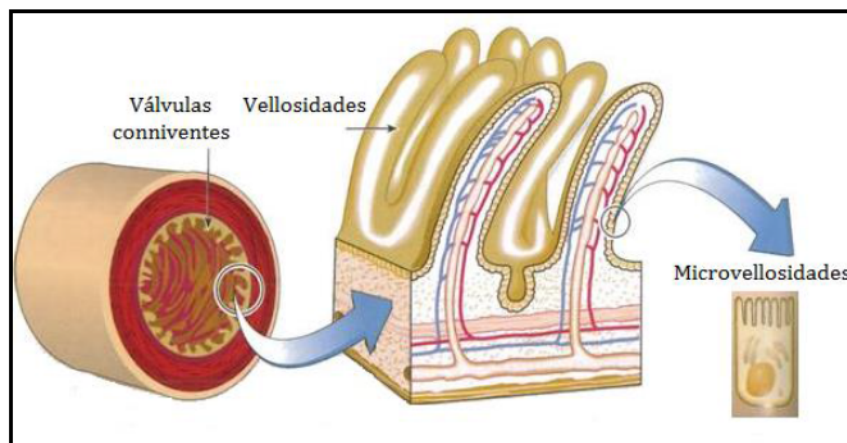


Figura III. 1.- Conformación de la superficie absorbente del intestino.

Se ha demostrado a través de numerosos estudios, que no existe un único mecanismo de absorción de nutrientes, siendo el mecanismo utilizado dependiente de las características fisicoquímicas de cada sustancia.

En la *Figura III. 2* se muestran los diversos mecanismos a través de los cuales una sustancia puede ser absorbida. El transporte a través del epitelio intestinal sano mediante la *ruta paracelular* (C) es mínimo debido a la presencia de uniones estrechas intercelulares, sólo pequeñas moléculas hidrofílicas son capaces de lograr un pasaje entre la unión de dos células, salvo que ocurra una modulación de las uniones celulares (F). El *transporte transcelular* puede tener lugar a través de un *mecanismo pasivo* (A) (Heymann y col., 1990) o a través del uso de *transportadores específicos* (B). Para que pueda ocurrir un flujo pasivo, la molécula debe tener las características fisicoquímicas adecuadas (tamaño, carga, lipofilidad, potencial de unión al hidrógeno, conformación). Ciertos compuestos que pueden ser absorbidos a través de esta ruta, también pueden ser sustratos del mecanismo de eflujo polarizado apicalmente (G), donde en algunos casos se transportan sustancias desde el interior de las células nuevamente al lumen intestinal. Por su parte, el mecanismo mediado por endocitosis (D) es mínimo en el intestino de los adultos y no suele ser un mecanismo probable de absorción. La mayoría de los compuestos son absorbidos a través del transporte pasivo o por la unión a transportadores específicos (Hillgren y col., 1995).

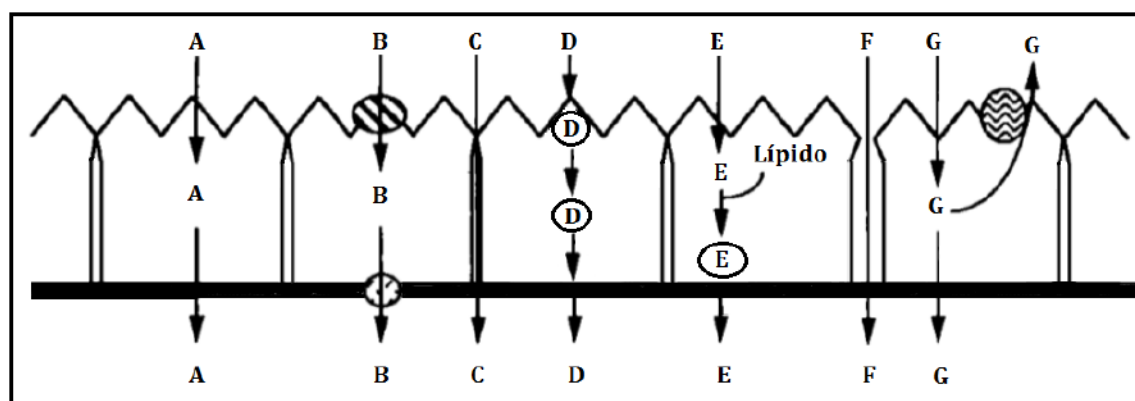


Figura III. 2.- Mecanismos de transporte a través de la pared intestinal.

A) Difusión transcelular pasiva.

B) Difusión transcelular mediada por transportadores.

C) Difusión paracelular.

D) Difusión transcelular mediada por endocitosis.

E) Difusión transcelular con incorporación dentro de partículas lipídicas.

F) Difusión paracelular con modulación de las uniones celulares.

G) Difusión transcelular modificada por el eflujo polarizado apicalmente.

Por lo general, los componentes de origen proteico que entran en contacto con el lumen intestinal son escindidos por diversas peptidasas celulares, generando desde aminoácidos libres hasta tripéptidos, los cuales pueden ser absorbidos de manera intacta hacia el citosol (*Figura III. 3*) (Grimble y col., 2000; Vermeirssen y col., 2004). Sin embargo, ocurre con poca frecuencia que péptidos o proteínas intactas puedan atravesar el lumen intestinal y llegar a la circulación sanguínea, sin sufrir ninguna modificación. Picariello y col. (2015) han demostrado que algunos dominios proteicos específicos de proteínas de leche, con potencial bioactividad o inmunogenicidad, serían capaces de sobrevivir a la digestión de las peptidasas intestinales.

La absorción de péptidos puede ocurrir a través de alguno de los mecanismos mencionados a continuación. Si bien existe una relación entre las características fisicoquímicas y el posible mecanismo de absorción, no se puede predecir el comportamiento de un péptido en particular.

Existe un *co-transporte o transporte activo secundario*, donde la energía necesaria para el pasaje proviene del co-transporte del sodio, es decir, los péptidos o aminoácidos libres se unen en la membrana de la microvellosidad con una proteína de transporte específica, la cual también requiere de la unión del sodio para que el transporte se pueda hacer efectivo. El ion sodio entra en la célula a

favor del gradiente electroquímico y entonces “arrastra” consigo al aminoácido o péptido (Nellans, 1991).

Por otra parte, Pappenheimer y col. (1994), demostraron que ciertos péptidos pequeños hidrofílicos podrían ser absorbidos a través del transporte paracelular, ingresando a través de la unión de dos células contiguas.

El gradiente de protones y el gradiente electroquímico transmembrana, generan la fuerza impulsora para la absorción de péptidos en el epitelio intestinal a través del *Transportador Pep-T1*, localizado en la *membrana apical*. Este transportador tiene un amplio rango de especificidad de sustratos, reconociendo ciertos di y tripéptidos (Fei y col., 1994; Pauletti y col., 1997), y también es conocido por ser el responsable del transporte transepitelial de ciertos antibióticos (Tsuji y col., 1996; Fei y col., 1994; Liang y col., 1995) (*Figura III. 3*). Pequeños péptidos son absorbidos a través del transportador PepT1 más rápidamente que los aminoácidos libres (Web y col., 1990); una vez que se encuentran en el interior de los enterocitos, los péptidos son generalmente hidrolizados por varias peptidasas intracelulares a aminoácidos libres en el citoplasma y entran en la circulación (Ganapathy y Leibach, 1999). También existen otros transportadores no tan conocidos ni estudiados, que son capaces de transportar a algunos de los oligopéptidos resistentes a las peptidasas, desde el lumen intestinal hacia el citosol (Addison y col., 1975; Himukai y col., 1980; Ganapathy y col., 1983).

La conformación que adoptan las proteínas en solución también influirá en la permeabilidad celular (Knipp y col., 1997; Tamura y col., 1997), aquellos que presenten mayor conformación β -plegada, por lo general son más lipofílicos y pueden ser absorbidos a través *difusión transcelular*.

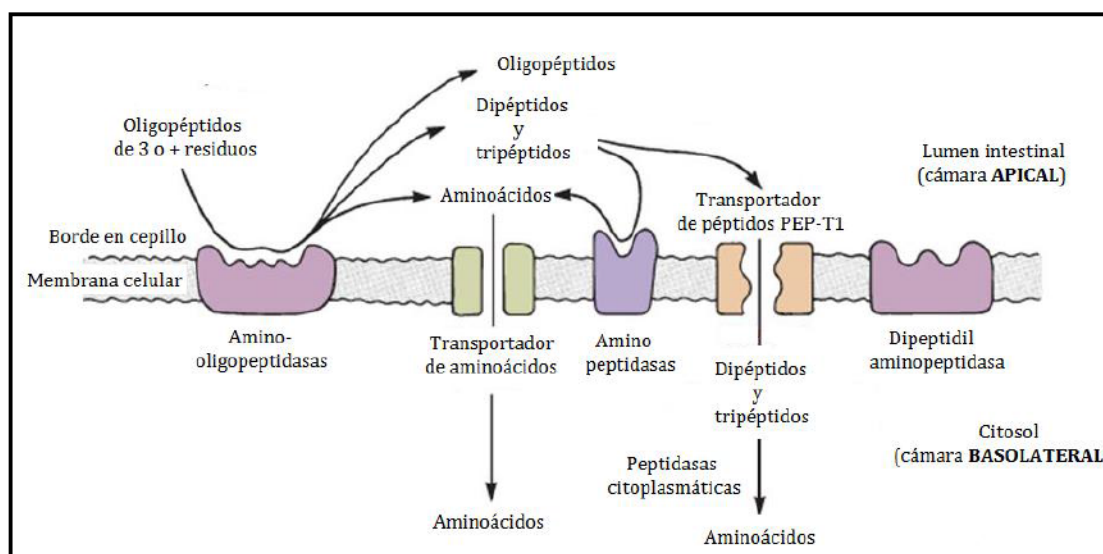


Figura III. 3.- Hidrólisis de oligopéptidos y absorción a través de transportadores.

Si bien muchas publicaciones afirman que el contenido de péptidos que logran llegar a la circulación intactos es menor al 1 % de los péptidos presentes en la mucosa intestinal y que la mayoría serían absorbidos como aminoácidos libres, di o tripéptidos (Gardner, 1984; Johnson, 2002; Pappenheimer y col., 1994), en los últimos años se han realizado numerosos estudios en los que se demuestra que péptidos de mayor longitud serían capaces de ser absorbidos de manera intacta. Pappenheimer y col. (1994) han sintetizado octapéptidos con D-aminoácidos, de manera de evitar que los mismos fueran reconocidos por las peptidasas o por las proteínas de transporte, y observaron que cerca del 50 % de dichos péptidos fueron absorbidos intactos. Por otra parte, Regazzo y col. (2010) han demostrado que el fragmento β -caseína 193-209, que es un péptido largo e hidrofóbico (17 aminoácidos y 1881 Da) con actividad inmunomoduladora que surge de la hidrólisis de la β -caseína con pepsina, pudo ser absorbido, siendo su principal mecanismo de transporte la transcitosis. Dichos autores afirman que es muy probable que haya resistido la hidrólisis gracias al elevado contenido de restos de prolina en su estructura (Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val). Otros autores también han demostrado que péptidos con alto contenido de prolina han logrado resistir la hidrólisis (Mizuno y col., 2004; Savoie y col., 2005). Por otra parte, Vermeirssen y col. (2002) han informado que, aunque en bajas concentraciones, el péptido lactokinina (Ala-Leu-Pro-Met-His-Iso-Arg) es absorbido intacto. Quiros y col. (2008) han demostrado que el pentapéptido antihipertensivo, His-Leu-Pro-Leu-Pro, proveniente también de la β -caseína, es capaz de ser absorbido y permanecer intacto; en este caso la ruta paracelular parecería ser la vía de

absorción. Por lo tanto, existen evidencias experimentales que demuestran que péptidos de más de 3 aminoácidos podrían ser absorbidos de manera intacta a través del epitelio intestinal, dependiendo de diversos factores como la masa molecular, la hidrofobicidad, la carga neta o la tendencia a agregarse (Fei y col., 1994; Aito-Inove y col., 2007).

El estudio de la absorción intestinal resulta una herramienta muy importante para evaluar la biodisponibilidad que presentará una cierta droga o componente bioactivo. Por ello, se han desarrollado numerosas técnicas, además de los tradicionales estudios *in vivo*, existiendo métodos fisicoquímicos y biológicos. Si bien la realización de aproximaciones integradas utilizando una combinación de modelos presenta ciertas ventajas, dado que se pueden estudiar al mismo tiempo distintos mecanismos y condiciones de absorción, por lo general, se selecciona y utiliza un único ensayo (Miret y col., 2004; Kerns y col., 2004).

Los estudios *in vivo* no suelen ser los ensayos más utilizados para el estudio de la absorción dado que se necesita utilizar un elevado número de animales y grandes cantidades de la muestra en estudio, junto con el hecho de que demandan mucho tiempo y que requieren análisis complejos, lo cual hace que resulten muy costosos. La mayoría de las veces se recurre a otras alternativas, que se pueden clasificar en dos grandes grupos: métodos que utilizan tejidos animales y métodos que utilizan cultivos celulares (Hillgren y col., 1995).

Métodos que utilizan tejidos animales:

- Utilización de un tejido animal: Es uno de los sistemas originales para estudiar la absorción intestinal *in vitro* y fue diseñado por Fisher y Parsons (1949). En un aparato de perfusión, se hace circular buffer Krebbs oxigenado conteniendo el compuesto de interés a través del lumen de un segmento intestinal aislado, recién extraído de un animal. Por otra parte, el lado serosal del segmento de intestino también se expone al buffer Krebbs oxigenado, pero no se hace circular. Si el tejido se encuentra oxigenado, puede permanecer viable por varias horas; es por eso que es importante la oxigenación del buffer. Luego del ensayo se evalúa el contenido del compuesto de interés en ambas cámaras, luminal y serosal.

Si bien hace unos años este era un método muy utilizado, presenta ciertas desventajas. El equipamiento necesario es complejo, se necesitan grandes cantidades de fluidos y, por lo tanto, del compuesto en estudio; por otra parte, el tejido permanecerá viable sólo

algunas horas y, además, debido a la gran área superficial de tejido con que se trabaja, se pueden adsorber sobre ella especies lipofílicas y compuestos cargados que impidan la absorción del compuesto de interés. Además, de un mismo animal se pueden extraer pocos segmentos, por lo cual este método no mostraría una gran ventaja en cuanto al número de animales a utilizar, respecto a los ensayos *in vivo*. Por último, los transportadores que son necesarios para la absorción de muchas sustancias, se encuentran en diferentes secciones específicas del intestino, por lo cual puede ocurrir que se utilice un segmento intestinal, donde no se encuentren los transportadores necesarios para la sustancia en estudio (Smyth y Taylor, 1957).

- Saco intestinal invertido: Este método fue diseñado en 1954 por Wilson y Wiseman, consiste en invertir un segmento intestinal sobre un vidrio y atar ambos extremos al mismo; luego, introducir con una jeringa desde uno de los extremos una solución conteniendo pequeñas burbujas de aire que permitan la oxigenación del tejido del lado serosal y a continuación introducir dicho saco con el vidrio en un vaso con una solución bien oxigenada que contenga el compuesto de interés. Dado que el volumen dentro del saco es muy pequeño, se observa un rápido aumento de la concentración de sustancias en él. Si bien es un ensayo rápido, se debe tener precaución con las incubaciones muy prolongadas porque las células van perdiendo viabilidad y ocurren cambios funcionales y morfológicos en el tejido. En este caso sucede lo mismo que en el ensayo diseñado por Fisher y Parsons, los transportadores que se encuentren presentes dependerán del segmento del intestino se haya extraído del animal (Levine y col., 1970; Wilson y Wiseman, 1954).
- Anillos intestinales: Esta metodología consiste en extraer el intestino del animal y cortarlo en secciones de entre 1 y 5 mm, los cuales son evertidos, se extraen los músculos que rodean la mucosa tisular y se colocan en un buffer bien oxigenado con el compuesto de interés, midiendo la absorción del mismo (Csáky, 1984). Se ha encontrado una buena correlación entre la biodisponibilidad *in vivo* y los resultados obtenidos a través de la absorción por parte de estos anillos intestinales (Porter y col., 1985). Esta metodología presenta la ventaja de poder obtener muchos anillos de un mismo animal y de ser un mecanismo fácil de reproducir, requiriendo poca experiencia previa para realizarlo. Sin embargo, a través de esta metodología sólo se mide la absorción, pero un compuesto puede ser absorbido y quedar 'secuestrado' en el interior de las células o ser metabolizado y nunca ser liberado al torrente sanguíneo. Además,

tanto la cámara serosal como la luminal se encuentran expuestas al compuesto en estudio, por lo cual no se podrá determinar la dirección de la absorción; y el análisis de las sustancias absorbidas resulta dificultoso dado que los compuestos deben ser extraídos del tejido, por lo cual generalmente se utilizan compuestos marcados radioactivamente. Por otra parte, al cortar el intestino, los enterocitos pueden resultar dañados y los compuestos pueden ser absorbidos a través de estas células dañadas, provocando un resultado erróneo sobre la absorción de un determinado nutriente. Por último, cabe señalar que en este caso ocurre lo mismo que en los dos casos anteriores, los transportadores que se encontrarán presentes dependerán del segmento de intestino en estudio y el tejido deberá mantenerse bien oxigenado a lo largo del estudio, para que pueda permanecer viable por algunas horas (Hillgren y col., 1995).

- Cámara de Ussing: Este método fue diseñado por Hans Ussing en 1946 y presenta diversas variantes y aplicaciones. Es un mecanismo que permite medir el transporte de iones, nutrientes y diversas drogas a través de tejidos epiteliales. Consiste en dos compartimentos separados por el epitelio utilizado (una sección del tejido en estudio o una monocapa celular crecida sobre un soporte permeable) conectados a un circuito eléctrico. Este aparato, por lo tanto, logra separar la cámara apical o mucosal de la basolateral o serosal. Los dos compartimentos se llenan con iguales volúmenes de una solución isotónica de manera de remover cualquier tipo de fuerza mecánica, química o eléctrica que pueda intervenir en la absorción. Existen equipos de diversos tamaños y formas, y a través del circuito eléctrico se puede medir no sólo la resistencia, la corriente y el voltaje, sino también otros parámetros más complejos como la impedancia y la capacitancia. Existen dos clases de equipos: la denominada cámara de circulación y la cámara perfundida en forma constante. Mientras que la primera es muy utilizada por distintos laboratorios por su simpleza, la segunda ofrece diversas ventajas. La *cámara de circulación* consiste en un sistema de tubos en forma de U, generalmente de vidrio, que contienen la solución experimental. Los tubos se pueden calentar si es necesario y gasificar, ya sea con aire o con diferentes gases tales como CO₂, O₂ o N₂. La gasificación tiene dos propósitos: oxigenar el contenido líquido y agitarlo para asegurar la convección completa. La forma en U de los tubos asegura una presión hidrostática igual en ambos lados de la cámara y, por lo tanto, evita posibles daños al tejido. Durante el curso de un experimento, por lo general se añaden las sustancias en estudio a uno o ambos lados del tubo de una manera secuencial, midiendo la absorción a través de las

variaciones del circuito eléctrico. La *cámara perfundida en forma continua*, por su parte, consiste en dos cámaras diseñadas para minimizar la presión hidrostática y, por lo tanto, evitar un daño grave al tejido durante la perfusión. Las soluciones en estudio se adicionan a ambos lados del tejido a través de tubos de polietileno. La temperatura se puede ajustar por medio de un sistema de calefacción de camisa de agua. Los electrodos para medir la corriente y el voltaje en ambos equipos, se insertan en los compartimentos.

Este sistema presenta varias ventajas respecto a los anteriormente descritos: permite el estudio de diferentes secciones del intestino, pueden estudiarse ambas direcciones de absorción, se pueden ajustar bien las condiciones en las que se realiza el ensayo y, además, se necesitan bajas cantidades del compuesto en estudio, pudiendo analizar fácilmente aquello que fue absorbido por HPLC. Sin embargo, el método puede resultar costoso y necesitar de personal altamente capacitado para su operación y mantenimiento. Además, al colocar el tejido sobre el equipo, podría resultar dañado, provocando falsos resultados de un alto flujo de compuestos (Clarke, 2009; Hillgren y col., 1995).

Métodos que utilizan cultivos celulares:

- **MDCK** (Mardin-Darby canine kidney): Es un sistema de células de riñón canino que resulta útil para realizar un rápido screening dado que estas células requieren un corto tiempo de cultivo (2-3 días). Tiene la ventaja de tener buenas correlaciones con los estudios realizados en el sistema de cultivo de células Caco-2, descritas a continuación, aunque la expresión de transportadores intestinales en MDCK no ha sido aún bien caracterizada (Irvine y col., 1999).
- **HT-29**: Son células de carcinoma de colon, que fueron desarrolladas por Fogh (1977). Por lo general se utilizan como método de screening para el estudio de agentes cancerígenos, también para inducir tumores en ratones y para estudiar factores que inducen la diferenciación. A diferencia de las células Caco-2, no se diferencian espontáneamente bajo condiciones normales de cultivo, sino que lo hacen gracias a la adición o substracción de varias sustancias químicas del medio de cultivo. Diferentes especies químicas pueden producir varios tipos celulares y mezclas de poblaciones celulares. Dado que estas células no son capaces de diferenciarse de la misma manera o

tan fácilmente como las Caco-2, tienden a no utilizarse para el estudio del transporte intestinal (Zweibaum, 1991).

- Caco-2: Es un sistema ampliamente utilizado para estudiar la absorción intestinal de diversas sustancias, son células de carcinoma de colon humano también aisladas originalmente por Fogh (Artursson, 1991; Fogh, 1977; Rubas, 1996; Yamashita, 2000). Estas células son reconocidas por expresar una amplia variedad de funciones de las células intestinales humanas y es por eso que se utilizan como modelo del epitelio intestinal (Hidalgo y col., 1989; Ranaldi y col., 2003), siendo ampliamente aceptadas como modelo *in vitro* para investigar y predecir la permeabilidad intestinal y el transporte de varios compuestos (Shimizu y col., 1997; Sun y col., 2009). Expresan varias enzimas intestinales (Hidalgo y col., 1989; Thwaites y col., 1993) y transportadores, incluyendo el transportador de péptidos Pep-T1 (Saito y col., 1993; Thwaites y col., 1993). El espacio intercelular que regula el transporte paracelular, también ha sido demostrado en las monocapas de células Caco-2 cuando las mismas fueron crecidas sobre membranas semipermeables (Hidalgo y col., 1989; Hashimoto y col., 1993). A pesar de que la actividad del transportador Pep-T1 y la difusión transcelular en las células Caco-2 son relativamente bajas en comparación con aquellas células epiteliales aisladas del intestino animal, las mismas son una de las líneas celulares más utilizadas.

Estas células son capaces de diferenciarse espontáneamente cuando son sembradas sobre membranas semipermeables, en las cuales forman una monocapa continua polarizada con un sistema de borde en cepillo bien definido en la superficie apical. No sólo representa a las células intestinales absorptivas, sino que también expresa ciertas hidrolasas intestinales, incluyendo disacaridasas, peptidasas y a la fosfatasa alcalina. Por todos estos motivos se ha vuelto un sistema muy utilizado para suplantar al epitelio intestinal.

- Caco2-TC7: La línea de cultivo Caco-2 ha demostrado ser heterogénea y ampliamente dependiente de las condiciones de cultivo, llevando a variaciones en las propiedades de transporte y de permeabilidad (Hosoja y col., 1996; Delie y Rubas, 1997; Vachon y Beaulieu, 1992). A fin de poder disminuir dicha heterogeneidad, se han aislado varios clones (Natoli y col., 2011; Sambuy y col., 2005) que desarrollaron marcadas diferencias en el potencial proliferativo y en la expresión de propiedades de diferenciación,

incluyendo la permeabilidad de la membrana (Woodcock, 1991; Bareis, 2002). Entre ellos puede mencionarse el clon TC7, el cual fue obtenido de un pasaje alto de células Caco-2 y caracterizado por su habilidad para transportar manitol a través de la ruta paracelular, testosterona por difusión pasiva y ácido taurocólico gracias a la utilización de transportadores activos de ácidos biliares (Chantret, 1994). Sólo se han encontrado pequeñas diferencias entre la línea Caco-2 y el clon TC7 en términos de la difusión pasiva y paracelular. Un estudio en el que se compararon cuatro líneas celulares Caco-2 concluyó que el clon TC7 consiste en una población más homogénea, provocando menores variaciones entre los resultados de absorción y presentando un mejor desarrollo de las uniones entre células (Turco y col., 2011).

La utilización de cultivos celulares frente a los ensayos con tejidos animales o ensayos *in vivo*, tiene como principal desventaja que provienen de sistemas cancerígenos en la mayoría de los casos y, por lo tanto, retienen ciertas características de estos sistemas, tales como poder ser crecidas y realizar varios pasajes de las mismas. Sin embargo, estos cultivos celulares imitan muchas de las propiedades metabólicas y de transporte de los sistemas intestinales. Si bien es verdad que a veces la expresión de ciertos transportadores o de ciertas actividades enzimáticas pueden tener variaciones entre los distintos pasajes, este modelo de estudio presenta varias ventajas que justifican su utilización, entre las que se encuentran: fácil manipulación, posibilidad de crecimiento sobre soportes porosos, requerimiento de poca cantidad de muestra, facilidad en el control de aquellas condiciones que pueden afectar el transporte, como el pH, la concentración de sodio y de otros iones en solución, la temperatura y la presencia de inhibidores metabólicos, entre otros.

En virtud de lo expuesto, en el presente trabajo se decidió utilizar un modelo de cultivo celular para realizar el estudio de la absorción intestinal, en particular, el clon TC7 de las células Caco-2, por las ventajas que ha demostrado poseer frente a la línea celular que le dio origen.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la absorción intestinal de péptidos antioxidantes de amaranto a través del modelo celular Caco-2-TC7.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- » Separar fracciones, con probada actividad antioxidante, mediante cromatografía de exclusión molecular FPLC a partir de los digeridos gastrointestinales de un aislado y de un hidrolizado con alcalasa (*AisDIG* y *HalcDIG*).
- » Simular la absorción intestinal de fracciones activas seleccionadas utilizando el sistema de monocapa de células Caco-2-TC7, evaluando este proceso mediante el análisis cromatográfico de las soluciones apicales y basolaterales.
- » Evaluar la actividad antioxidante remanente luego de la absorción.

III. 1.- Separación de fracciones por cromatografía FPLC de filtración en gel.

Se realizó la separación mediante FPLC de exclusión molecular de las fracciones solubles en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) de los dos digeridos (*AisDIG* y *HalcDIG*). Las corridas cromatográficas se realizaron a temperatura ambiente, utilizando una columna preparada con el relleno Superdex 30 (GE Healthcare, Suecia), en un equipo AKTA Purifier (GE Healthcare Bioscience AB), empleando como fase móvil el mismo buffer en el que se encontraban solubilizadas las muestras. Superdex 30 es una mezcla de dextrano y agarosa con un rango de separación óptimo menor a 10kDa. La columna utilizada presentaba un volumen total (V_t) de 118 ml, el volumen de inyección fue de 2 ml y el flujo de 0,8 ml/min. La calibración previa de la columna se realizó utilizando azul dextrano para el volumen de exclusión (V_0 = 40,75 ml), ribonucleasa A (13,7 kDa), aprotinina (6,5 kDa), vitamina B₁₂ (1,35 kDa) y tirosina (181,2 Da). Los polipéptidos y péptidos fueron detectados midiendo la absorbancia a 280 nm. Se colectaron fracciones cada 2 minutos a partir del V_0 , obteniendo un total de 51 fracciones de 1,6 ml cada una.

III. 2.- Ensayo ORAC sobre fracciones.

Dada la alta cantidad de fracciones colectadas de cada una de las muestras, en una primera instancia se realizó un screening de la actividad antioxidante mediante el ensayo ORAC sobre muestras constituidas por 3 fracciones FPLC consecutivas. Se midió el porcentaje de inhibición de los radicales peroxilo, como fue previamente descrito en el *Capítulo II (Sección II.2)*, obteniéndose el valor del Trolox equivalente (μ M) a partir de la curva de calibración (6,25 a 100 μ M). En una segunda instancia, se analizó la actividad secuestrante de radicales peroxilo (ORAC) de aquellas fracciones individuales originales que constitúan las muestras con mayor actividad en el primer screening, obteniéndose nuevamente como parámetro de actividad antioxidante el valor del Trolox equivalente (μ M).

III. 3.- Ensayo HORAC sobre fracciones.

Se midió la capacidad para inhibir la formación de radicales hidroxilo sobre las mismas fracciones sobre las que se realizó el ensayo ORAC, utilizando el mismo protocolo descripto en la *Sección II.3*. Se calculó el valor de ácido clorogénico equivalente (mg/ml) para cada una de las muestras.

III. 4.- Simulación de la absorción intestinal.

III. 4. a.- Materiales y medios de cultivo utilizados.

Medios utilizados:

- *Buffer fosfato salino (PBS)*: KH_2PO_4 0,144 g/l, Na_2HPO_4 0,795 g/l, NaCl 9 g/l, pH = 7,3, esterilizado en autoclave.
- *Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 15 % de suero fetal bovino (SFB)*: 1 sobre de DMEM (P3030-001, EMEVE Medios de laboratorio Microvel SRL) con 4,5 g/l de glucosa, 13 ml de Penicilina/Estreptomicina (15140-122 GIBCO PenStrep x 100 ml, 1000U/Pen + 1000 ug/ml Strep), 2 g de NaHCO_3 , 0,5 g de gentamicina, 13 ml de aminoácidos no esenciales (MEM Non-Essential Amino Acids, GIBCO), 180 ml de suero fetal bovino (SFB)(inactivado a 65°C)(Internegocios SA), 1l de agua para irrigación quirúrgica, pH = 7,4. El medio se esterilizó por filtración con membrana con tamaño de poro de 0,22 μm (filtro GP Millipore Express Plus membrane 0,22 μm) y se almacenó a 4 °C.
- *Tripsina*: 75 mg de tripsina (25200-056 GIBCO 0,25% Trypsin EDTA 1X), 20 mg de EDTA y 100 ml de PBS. Se esterilizó por filtración con membrana con tamaño de poro de 0,22 μm , se fraccionó en tubos de 2,5 ml y se guardó a -20°C hasta su utilización.
- *Etanol 70% v/v*.
- *Azul tripán* (T6146 SIGMA Trypan Blue powder, BioReagent, 0,4% en PBS 2X).
- *Dimetilsulfóxido (DMSO)*(Anedra).

III. 4. b.- Cultivo de las células Caco2-TC7.

1° Descongelación de células.

Las células, que se encontraban en nitrógeno líquido congeladas a -80°C en crioviales, se descongelaron en un baño de agua a 37°C y luego se centrifugaron a $1300 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, bajo el flujo laminar, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 ml de DMEM con 15 % de SFB, transfiriendo la suspensión a una botella de 25 cm^2 donde se agregaron 4 ml más de medio de cultivo. Dicha botella se incubó en estufa a 37°C con un 5 % de CO_2 , cambiándole el medio cada dos días, hasta llegar a confluencia (alrededor de 7 días). Luego se tripsinó (*ver procedimiento a continuación*) y se transfirieron las células a otra botella de 25 cm^2 , procediendo de la misma manera que con la botella anterior; a la semana se volvió a tripsinar y se transfirió esta vez a una botella de 75 cm^2 . Luego de mantener dicha botella durante una semana en incubación, cambiándole el medio cada dos días, se volvió a tripsinar, se hizo un recuento de las células (*ver procedimiento a continuación*) y si el recuento era suficiente, se prepararon placas o insertos, además de otra botella de reserva.

2° Tripsinado y recuento de células.

Una vez que la botella llegó a confluencia, se realizó una observación macro y microscópica de la misma para verificar que no existiera contaminación ni anomalías en el cultivo. Luego, se descartó el medio con una pipeta estéril bajo flujo laminar, se lavó 3 veces con PBS y se le agregó la cantidad adecuada de tripsina sobre la pared opuesta a la monocapa (1 ml para botellas de 25 cm^2 y 2 ml para botellas de 75 cm^2), se incubó en estufa a 37°C durante 5 minutos aproximadamente, hasta observar el desprendimiento de la mayor parte de la monocapa. A intervalos de 2 minutos se agitó la botella para facilitar el desprendimiento. Luego se retiró la botella de la estufa y, bajo flujo laminar, se adicionó el volumen de DMEM correspondiente (5 ml para botellas de 25 cm^2 o 10 ml para botellas de 75 cm^2) y, con la misma pipeta, luego de desprender completamente las células de la botella, se transfirió todo el contenido a un tubo falcon cónico estéril de 15 ml. Se centrifugó durante 5 minutos a $1300 \times g$ a temperatura ambiente y luego, bajo flujo laminar, se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 5 o 10 ml de DMEM, según lo que correspondía, y con la misma pipeta se tomó una alícuota para realizar la cuantificación de las células.

Cuantificación de las células.

Se mezclaron 50 µl de la suspensión celular con 50 µl de azul tripán y se colocó una gota de dicha mezcla en una cámara de Neubauer. Se realizó el conteo en un microscopio invertido; donde se procedió a contar en diagonal dos cuadrantes opuestos (cada cuadrante tiene 16 cuadrados). El colorante azul tripán tiñe las células que no están viables, por lo cual sólo se contaron aquellas no coloreadas. Una vez obtenido el número de células totales por ml se realizó la dilución correspondiente de acuerdo a la concentración de células deseada.

3° Ensayos de citotoxicidad.

Al realizar ensayos con los cultivos celulares, es importante realizar, en paralelo, al menos dos ensayos de citotoxicidad capaces de detectar, mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con las estructuras y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o para el desarrollo de determinadas funciones celulares. Dentro de los mecanismos evaluados se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular (Repetto, 2002). La citotoxicidad celular se define entonces como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. En este caso, se realizaron dos ensayos de citotoxicidad, exponiendo a las células a las mismas concentraciones de muestras y durante los mismos tiempos a los que las células estarán expuestas en el ensayo de absorción.

- a) Ensayo del ROJO NEUTRO (Di Virgilio y col., 2010; Reinecke y Helling, 2002; Zuang, 2001).

A través de este ensayo se estudia la funcionalidad LISOSOMAL. El rojo neutro es captado por las células, específicamente por los lisosomas y en la medida en que la célula pierde viabilidad, por acción de alguno de los compuestos en estudio, mayor cantidad de colorante quedará libre en el medio, dado que sólo las células viables serán capaces de retener el colorante en su interior. Por lo tanto, una disminución en la absorbancia indicará una pérdida de funcionalidad de estas organelas.

Se sembraron un total de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos. Cuando las células llegaron a confluencia, se lavó dos veces con PBS y se adicionaron las muestras a estudiar, las cuales se encontraban solubilizadas en DMEM de adhesión (DMEM sin SFB). Se incubaron las muestras junto con las células durante 3 horas, que es el mismo tiempo que

el que las muestras estarán en contacto luego con los insertos, a 37 °C con un 5 % de CO₂. Se lavó con PBS, se reemplazó el medio por uno nuevo conteniendo 100 µg/ml de rojo neutro, y se incubaron las células durante 2 horas. Se descartó el medio con rojo neutro y se lavó 2 veces con PBS a 37 °C, para remover todo el colorante que no había sido incorporado por las células. Luego, se fijaron las células con una solución al 5 % de formaldehído, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, se enjuagaron 2 veces con PBS, se solubilizó el colorante con DMSO, dejando reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Y, por último, se transfirió el sobrenadante a otra placa, midiendo la absorbancia a 540 nm. Se compararon los resultados de las células tratadas con aquellas sin tratar, en las que se colocó medio DMEM en lugar de muestra (control de viabilidad positivo). Los valores de absorbancia se corrigieron restándoles un blanco compuesto por las células y las muestras a estudiar, pero sin colorante. Se realizó además un control de lisis positivo (+) agregando etanol al 25% en medio de cultivo. Se graficó el % de viabilidad celular en función de la concentración de muestra, asumiendo un 100% de viabilidad en aquellas células en las que no se había adicionado muestra (control de viabilidad (+)).

b) Ensayo del dimetil tetrazolio (MTT) (Di Virgilio y col., 2010; Eisenbrand y col., 2002; Jimenez y col., 2002)

A través de este ensayo se estudia la funcionalidad MITOCONDRIAL. La sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio) es captada por las células y reducida por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán. El producto de reacción, queda retenido en las células y luego se solubiliza por la adición de DMSO. El MTT reducido es cuantificado mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración de amarillo a azul. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de viabilidad celular. Por ello, la determinación de la capacidad de las células de reducir MTT a formazán después de la exposición a un compuesto en estudio permite obtener información acerca de la toxicidad del mismo. Mayor desarrollo del color indicará, por lo tanto, mayor viabilidad. La pérdida o disminución de la actividad mitocondrial sugiere la iniciación de procesos apoptóticos.

Se sembraron un total de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos, incubándolas a 37 °C con 5 % de CO₂, durante una semana, hasta llegar a confluencia. Se adicionaron las muestras y se incubó durante 3 horas a 37 °C con un 5% de CO₂. Dicho tiempo es el mismo

que el que las muestras estarán en contacto luego con los insertos. Luego, se lavó con PBS y se adicionó medio conteniendo 0,5 mg/ml de MTT, incubando en estufa durante 3 horas. Transcurrido dicho tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS y se extrajo el colorante captado por las mitocondrias adicionando 100 µl/pocillo de DMSO, dejando 10 min en agitación suave, tomando el sobrenadante, transfiriéndolo a otra placa y midiendo la absorbancia a 570 nm. Los valores de absorbancia se corrigieron restándoles un blanco (células y muestras a estudiar, sin colorante). La viabilidad celular se graficó como un % del control, asumiendo un 100% de viabilidad para aquellas células a las que no se les adicionó ninguna muestra.

4° Monocapas de células Caco2-TC7.

Para obtener monocapas celulares confluentes, las células Caco2-TC7 provenientes de cultivos confluentes realizados en cajas de 75 cm² se sembraron en insertos de poliéster (Transwell (Corning), 0,4 µm, 12 mm de diámetro) (*Figura III. 4*) en una concentración de 1 x 10⁵ células/cm², sembrando 200 µl de la suspensión de células sobre el inserto (cámara apical) y colocando 600 µl DMEM en el pocillo (cámara basolateral).



Imagen III. 4.- Inserto de poliéster.

En la *Figura III. 5* se representa un inserto, donde se indican las cámaras apical y basolateral creadas y los dos sentidos en los que se puede estudiar el flujo de componentes, flujo APICAL, que es el analizado en el presente trabajo, y corresponde al pasaje desde la cámara apical hacia la basolateral; y el flujo BASOLATERAL, que estudia el pasaje contrario, desde la cámara basolateral hacia la apical. Cada dos días se cambió el medio de cultivo de ambas cámaras, midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) luego de cada cambio de medio (*ver procedimiento a continuación*).

Las células Caco2-TC7 empleadas en la elaboración de la monocapa celular correspondieron a los pasajes N° 39-40 del cultivo inicialmente adquirido en la ATCC.

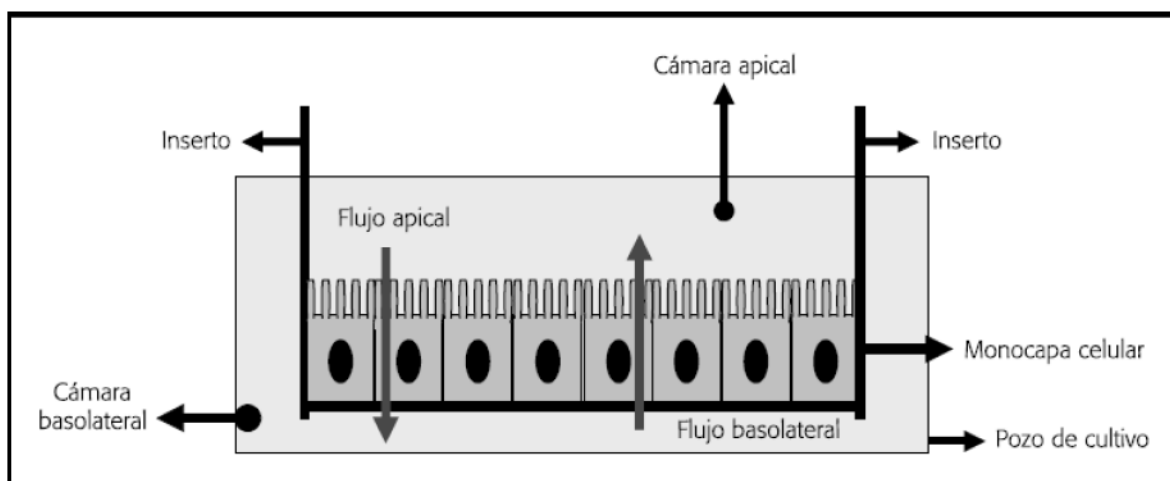


Figura III. 5.- Esquema gráfico de un inserto.

5° Medición de la Resistencia Transepitelial (TEER).

La TEER (ohmios.cm^2 ($\Omega.\text{cm}^2$)) generada por las capas de epitelio cultivado se utilizó para evaluar la confluencia e integridad de las monocapas. Estas mediciones se realizaron empleando un voltímetro con electrodos, Millicell®-ERS (Millipore, USA) (*Figura III. 6*).



Figura III. 6.- Voltímetro Millicell ®-ERS.

Antes de realizar las medidas, se esterilizaron los electrodos, sumergiéndolos en etanol 70 % v/v durante 20 minutos; y a continuación se estabilizaron al sumergirlos 5 minutos en el medio de cultivo, que se encontraba a temperatura ambiente. Las placas con los insertos se sacaron de la estufa y se colocaron dentro del flujo laminar, hasta alcanzar la temperatura ambiente. A continuación, se midió la resistencia de los pocillos 'blanco', es decir, de

aquellos en los que no se habían sembrado células, para lo cual se colocó uno de los electrodos en la cámara apical y el otro en la cámara basolateral y se midió la resistencia generada entre ambas. Luego se midió la resistencia en todos los insertos con muestra, por triplicado. Por último, se calculó la TEER para cada uno de los insertos, de acuerdo a la *Ecuación III. 1*.

La TEER se utiliza como un indicador de la ‘estrechez’ de la unión entre las células, y está correlacionado con el *transporte paracelular* en las células Caco2-TC7.

$$\text{TEER } (\Omega.\text{cm}^2) = (\text{Resistencia total} - \text{Resistencia blanco})(\Omega) \times \text{Área } (\text{cm}^2) \quad [\text{Ec. III.1}]$$

Siendo el área del inserto = $\pi \times \text{radio}^2$

6° Determinación de la actividad transportadora.

La actividad transportadora de la monocapa celular fue determinada en dirección apical – basolateral. Una vez formada la monocapa (TEER constante), se adicionaron 0,5 ml de PBS en las cámaras apical y basolateral del inserto y se incubó durante 20 minutos en estufa a 37 °C con 5 % de CO₂, para estabilizar los insertos. Transcurrida dicha incubación, el PBS de ambas cámaras fue removido y en la cámara apical del inserto se sembraron 200 µl de las soluciones de péptidos en estudio, mientras que en la cámara basolateral, o receptora, se colocaron 600 µl de PBS, dejando en incubación durante 3 horas. Luego de transcurrido dicho tiempo, se tomaron muestras de ambas cámaras para su análisis.

III. 5.- Análisis por RP-HPLC analítica.

Tanto las muestras tomadas de las cámaras apical y basolateral luego de la incubación, como cada una de las muestras de originales colocadas en la cámara apical, fueron analizadas por RP-HPLC. Para ello se utilizó una columna analítica Sephasil Peptide C8, 12 µm, ST 4,6/250 (Farmacia Biotech), con un equipo HPLC Waters (Waters Corp., Milford, MA) equipado con un detector de arreglo de diodo (DAD). Para la corrida se utilizó una elución en gradiente utilizando dos solventes: el solvente A fue una mezcla de agua y acetonitrilo (98:2) con ácido trifluoroacético (TFA) (650 µl/l), mientras que el solvente B estuvo compuesto por una mezcla de agua y acetonitrilo (35:65) con TFA (650 µl/l). Las muestras fueron eluidas con un gradiente lineal del solvente B en A (0 a 100% en 55

minutos, con un flujo de 1,1 ml/minuto), colectando fracciones cada un minuto, desde el minuto 2 hasta el 60, con un sistema de detección a 210 y 280 nm.

III. 6.- Determinación de la concentración peptídica.

Se determinó la concentración peptídica en las distintas muestras (original, apical y basolateral) mediante el método de Lowry antes descripto. En los casos en los que la concentración fue menor a 0,1 mg/ml, se utilizó un método de Lowry modificado por Stoscheck (1990), que es un método más sensible. En esos casos, se tomaron 100 µl de las muestras y se mezclaron con 100 µl del reactivo de Lowry modificado (Na_2CO_3 6,66% p/v, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,13% p/v, tartrato de Na y K 0,066% p/v de, SDS 0,33% p/v, NaOH 1,33% p/v), se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, momento en el cual se agregaron 50 µl de la solución de Folin (50 % v/v en agua bidestilada) (Folin Ciocalteu, Anedra), se agitaron enérgicamente y se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650. Se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (Sigma) (0-0,1 mg/ml).

III. 7.- Separación de fracciones por FPLC.

Se llevó a cabo la separación de fracciones de acuerdo a su tamaño molecular mediante el principio de filtración en gel, utilizando una columna de exclusión molecular preparativa Superdex 30, con rango de separación menor a 10 kDa. El mismo tipo de columna (en versión analítica) se utilizó previamente como parte de la caracterización molecular de las muestras (*Capítulo I*).

En la *Tabla III. 1*. se muestran los volúmenes de elución (V_e) correspondientes a la altura máxima de los picos de las sustancias patrón empleadas para la realización de la curva de calibración. Se utilizó azul dextrano como un indicador del frente de corrida (V_0). Se obtuvo la siguiente expresión para el cálculo de la masa molecular: $\log MM = 1,549 - 2,546 \times K_{av}$ ($r^2=0,978$), siendo $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, siendo V_e el volumen de elución de la fracción en estudio.

Tabla III.1.- Patrones de peso molecular FPLC.

Muestra	MM (kDa)	V_e (ml)
Azul dextrano		40,75
Ribonucleasa A	13,7	51,54
Aprotinina	6,5	63,15
Vitamina B ₁₂	1,35	88,97
Tirosina	0,18	106,82

Se llevó a cabo la separación de las fracciones correspondientes a las dos muestras obtenidas por digestión gastrointestinal simulada (*AisDIG* y *HalcdIG*) dado que sus componentes peptídicos serían los potenciales productos que entrarían en contacto con el sistema de absorción intestinal.

En las *Figuras III. 7* y *III. 8* se muestran los cromatogramas obtenidos para *AisDIG* y *HalcdIG*, respectivamente. Si bien, como se mencionó anteriormente en la sección de *Materiales y Métodos, III.1*, se colectaron fracciones de 1,6 ml, inicialmente se juntaron de a

3 fracciones consecutivas, obteniéndose 17 muestras a las que se les realizó una primera evaluación de la actividad antioxidante. Dichas muestras se señalan en los cromatogramas.

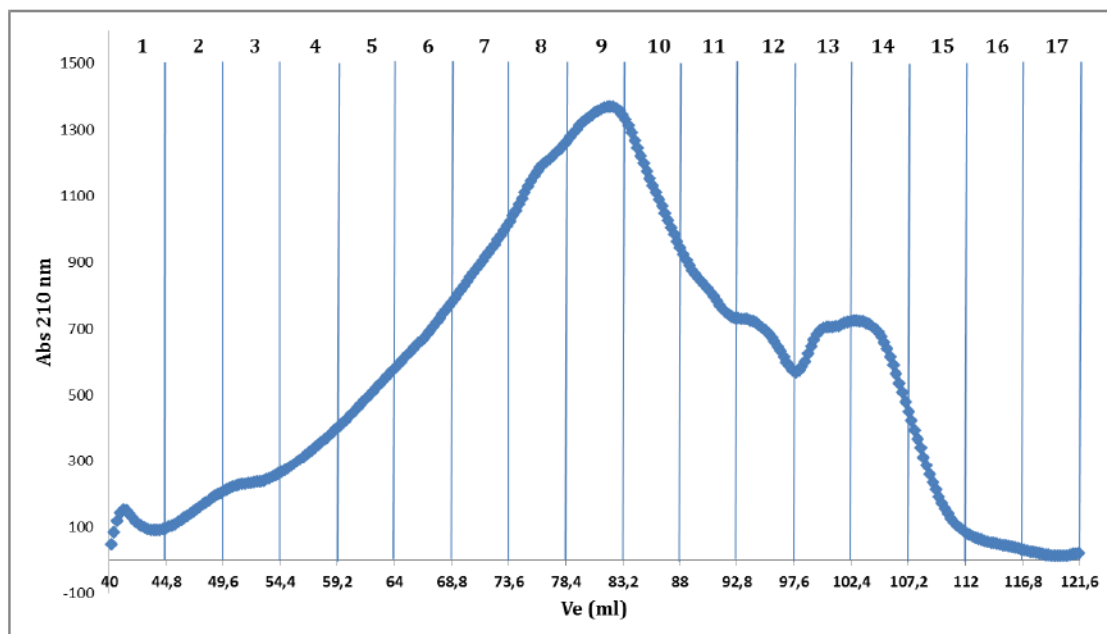


Figura III. 7.- Cromatograma FPLC de exclusión molecular para AisDIG, señalando las muestras utilizadas para el primer screening de actividad antioxidante.

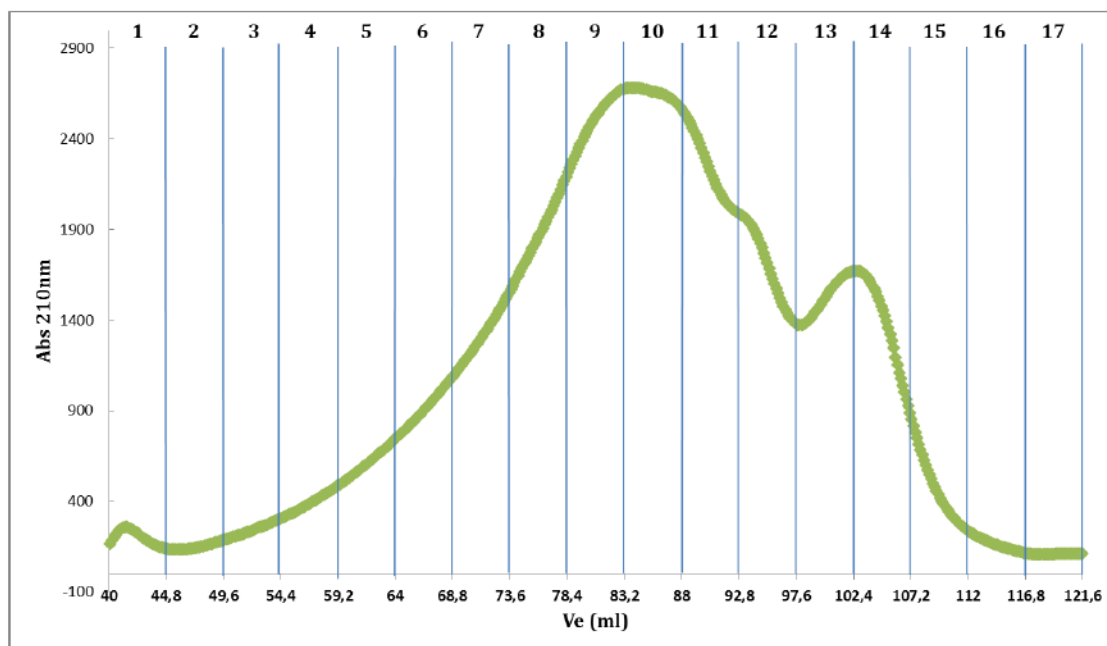


Figura III. 8.- Cromatograma FPLC de exclusión molecular para el HalcDIG, señalando las muestras utilizadas para el primer screening de actividad antioxidante.

Al comparar los perfiles cromatográficos de ambos digeridos se pueden observar algunas similitudes. Los picos más importantes en ambas muestras aparecen en un rango de volúmenes de elución similares (64 a 107,2 ml, muestras 6 a 14), y se encuentran constituidos, de acuerdo a la curva de calibración obtenida, por moléculas entre 0,2 y 6,1 kDa, es decir, por péptidos de entre 2 y 55 aminoácidos, teniendo en cuenta que la masa molecular promedio de un aminoácido es 110 Da. Asimismo, en ambos casos las máximas absorbancias a 210 nm corresponden a las fracciones 9 (en el caso de *AisDIG*) o 9 y 10 (para *HalcDIG*), las cuales contienen péptidos con masas moleculares de entre 1 y 2 kDa, es decir péptidos de entre 9 y 19 aminoácidos. Si recordamos que la mayoría de los péptidos bioactivos estudiados presentan entre 2 y 20 aminoácidos, resulta interesante la composición observada para los digeridos.

III. 8.- Ensayos ORAC y HORAC sobre fracciones.

En la *Tabla III.2* se puede observar cómo estaban constituidas las 17 muestras utilizadas para el primer screening de actividad antioxidante. Como se indicó previamente, cada muestras se obtuvo mezclando tres fracciones consecutivas, a partir de $V_e = 40$ ml (ya que $V_0 = 40,75$ ml).

Tabla III. 2.- Constitución de las 17 muestras obtenidas a partir de las fracciones de FPLC.

	Fracciones de origen	V_e (ml)	Masas moleculares (kDa)		Fracciones de origen	V_e (ml)	Masas moleculares (kDa)
1	25, 26 y 27	40,0 a 44,8	>13,7	9	49, 50 y 51	78,4 a 83,2	1,4 – 2
2	28, 29 y 30	44,8 a 49,6	>13,7	10	52, 53 y 54	83,2 a 88,0	1 - 1,4
3	31, 32 y 33	49,6 a 54,4	>12,6	11	55, 56 y 57	88,0 a 92,8	0,7 – 1
4	34, 35 y 36	54,4 a 59,2	8,7 - 12,6	12	58, 59 y 60	92,8 a 97,6	0,5 - 0,7
5	37, 38 y 39	59,2 a 64,0	6,1 – 8,7	13	61, 62 y 63	97,6 a 102,4	0,3 - 0,5
6	40, 41 y 42	64,0 a 68,8	4,2 - 6,1	14	64, 65 y 66	102,4 a 107,2	0,2 – 0,3
7	43, 44 y 45	68,8 a 73,6	2,9 - 4,2	15	67, 68 y 69	107,2 a 112,0	<0,18
8	46, 47 y 48	73,6 a 78,4	2 – 2,9	16	70, 71 y 72	112,0 a 116,8	<0,18
				17	73, 74 y 75	116,8 a 121,6	<0,18

La actividad antioxidante de las muestras fue evaluada mediante los métodos ORAC y HORAC dado que, como ya se mencionó anteriormente, son métodos muy sensibles, que no requieren de elevadas concentraciones proteicas y que reflejan diferentes mecanismos de acción antioxidante. Para expresar los resultados del ensayo ORAC, se construyó una curva de calibración con Trolox (*% de Inhibición vs. Concentración de Trolox (μM)*) y se calculó el valor de Trolox eq. (μM) para las 17 muestras de cada digerido. En el caso del ensayo HORAC se realizó el mismo procedimiento pero usando como sustancia de referencia el ácido clorogénico.

A continuación, se pueden observar los gráficos con los correspondientes valores de Trolox eq. (μM) y de Ácido Clorogénico eq. (mg/ml) para cada una de las muestras provenientes de *AisDIG* (Figura III. 9. a y b) y *HalcDIG* (Figura III. 10. a y b).

Comparando los resultados obtenidos frente a los dos métodos ensayados, podemos observar que ambas muestras no sólo presentan un perfil de exclusión molecular por FPLC con similitudes, sino también que el comportamiento de las fracciones frente al secuestro de radicales peroxilo (interrupción de la cadena radicalaria, ORAC), y frente a la prevención de la formación de radicales hidroxilo (HORAC) también mostró características similares. Para los digeridos analizados, por ambos métodos, las muestras más activas estuvieron comprendidas entre la 6 y la 14 (masas moleculares entre 6,1 y 0,2 kDa), las cuales también abarcaron la mayor área relativa, un 81 % del área total en el caso del *AisDIG* y un 87 % para el *HalcDIG*.

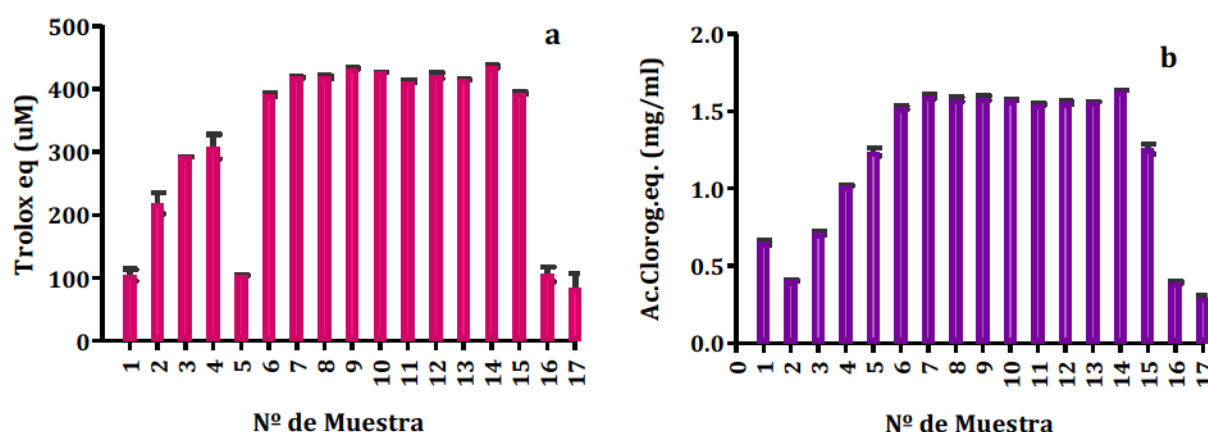


Figura III. 9. a.- Valor Trolox eq (μM) de las muestras provenientes de *AisDIG*.

b.- Valor Ácido clorogénico eq. (mg/ml) de las muestras provenientes de *AisDIG*.

Los resultados se expresan como el promedio \pm SD ($n = 3$)

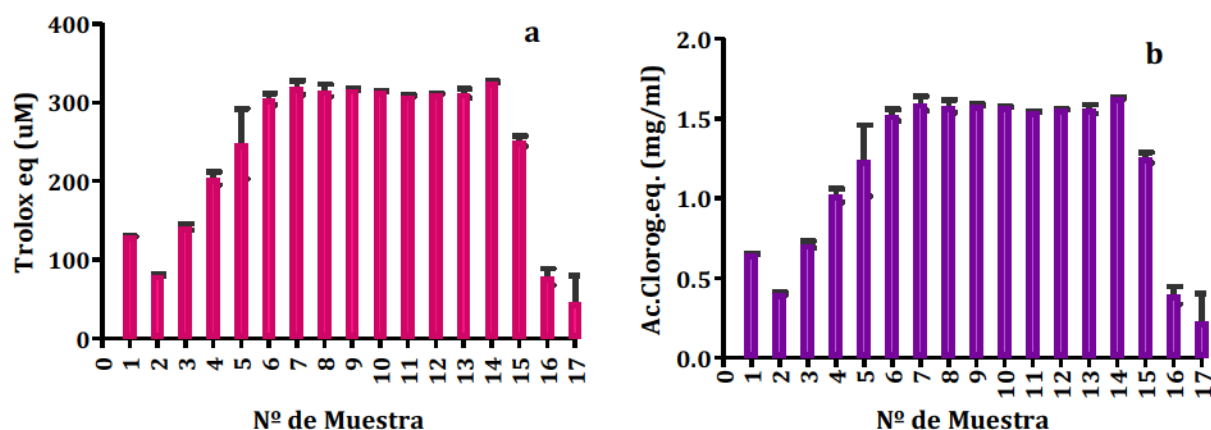


Figura III. 10. a.- Valor del Trolox eq (μM) de las muestras provenientes de HalcDIG.

b.- Valor del Ácido Clorogénico eq. (mg/ml) de las muestras provenientes de HalcDIG.

Los resultados se expresan como el promedio \pm SD ($n = 3$)

Las muestras que presentaron menor actividad en todos los casos (16 y 17) corresponden a la última zona de los cromatogramas (masas moleculares menores a la de un aminoácido) donde la presencia de componentes detectables a 210 nm es muy baja, con áreas relativas de entre 0,4 y 1,3 %. Mientras que las muestras 1 a 5, correspondientes a moléculas de masas moleculares mayores a 6,1 kDa y la muestra 15 (masas moleculares menores a 0,2 kDa) presentaron actividades intermedias.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se seleccionaron aquellas muestras que demostraron poseer mayor capacidad antioxidante por ambas metodologías, para evaluar a través de los mismos ensayos y protocolos la actividad de sus fracciones constituyentes. Para ambos digeridos, se evaluaron las fracciones 6 a 14 (Tabla III. 2). En la Figura III. 11 se pueden observar los resultados obtenidos para las fracciones de AisDIG, mientras que en la Figura III.12 los correspondientes a las fracciones de HalcDIG.

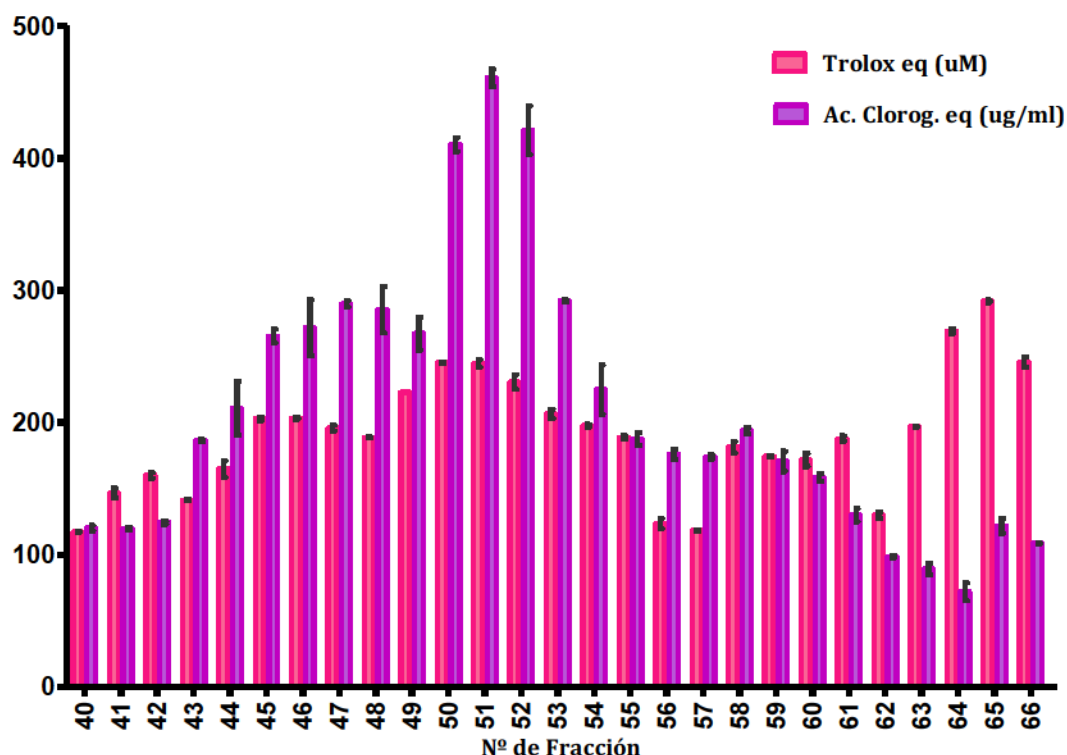


Figura III. 11.- Valores Trolox eq (μM) y Ac.Clorogénico eq. ($\mu\text{g/ml}$)

para las fracciones constituyentes de las muestras 6-14 de AisDIG.

Los resultados se expresan como el promedio \pm SD ($n = 3$)

En el caso de las fracciones separadas a partir de *AisDIG*, se puede observar que, si bien todas las fracciones presentaron algún nivel de actividad por el ensayo ORAC, algunas de ellas exhibieron mayores valores de Trolox eq. Mientras que en las fracciones 64 - 66 los valores se encontraron entre 242 y 293 μM , para las fracciones 50 - 52 los valores estuvieron entre 225 y 248 μM . En el caso del ensayo HORAC, se observan más diferencias entre las actividades de las distintas fracciones, siendo las fracciones 50 - 52 las más activas, con valores de ácido clorogénico eq. entre 403 y 467 $\mu\text{g/ml}$, seguidas de las fracciones 45 a 49 y la 53, con valores entre 250 y 303 $\mu\text{g/ml}$ (*Figura III. 11*).

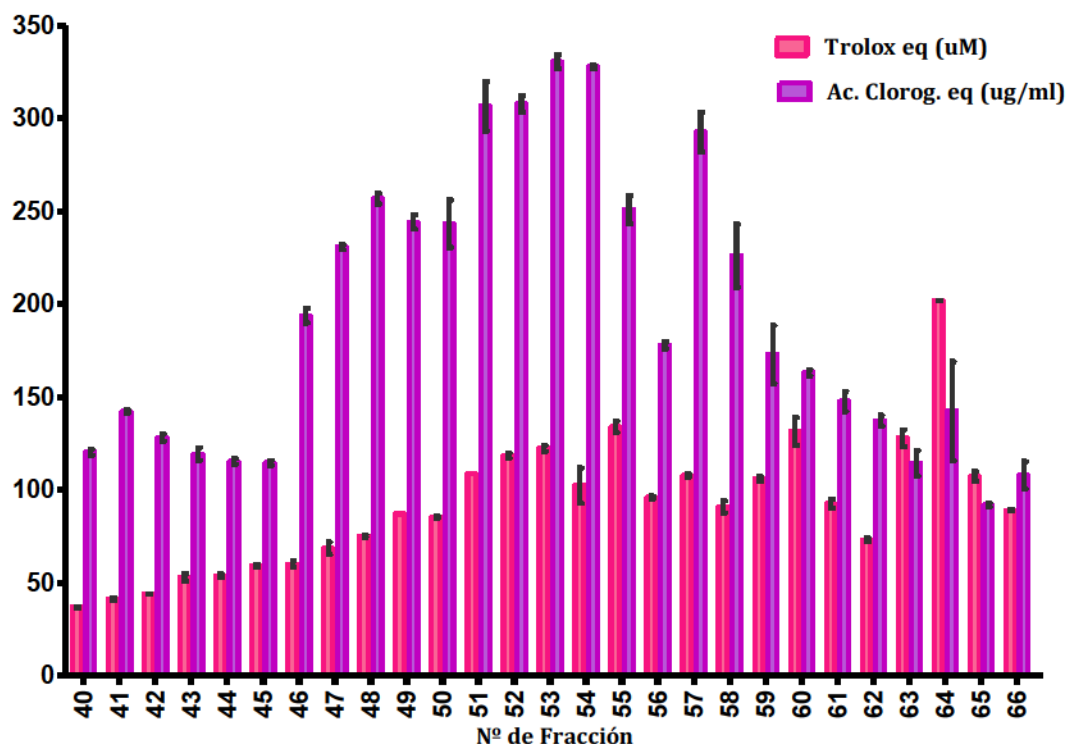


Figura III. 12.-Valores del Trolox eq (μM) y Ac.Clorogénico eq. (ug/ml) para las fracciones constituyentes de las muestras 6-14 de HalcDIG. Los resultados se expresan como el promedio ± SD (n = 3)

En el caso de las fracciones provenientes de *HalcdIG*, al analizar los resultados del ensayo ORAC, se observa una fracción de mayor actividad (64) con un valor de Trolox eq. de 202 μM, seguida por varias fracciones con actividades comparables (51-53, 54, 55, 57, 59, 60 y 63) con valores de Trolox eq. entre 100 y 139 μM, presentando el resto menores valores. Mientras que para el ensayo HORAC, las fracciones más activas fueron 51-54 y 57 con valores de ácido clorogénico eq. entre 293 y 334 μg/ml y luego las fracciones 47-50, 55 y 58, con valores de ácido clorogénico eq. entre 209 y 303 μg/ml (*Figura III. 12*).

III. 9.- Medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER)

Para evaluar si diferentes sustancias, péptidos en este caso, serían capaces de atravesar una monocapa celular que simula la pared intestinal, es fundamental asegurarse que dicha monocapa se encuentre bien formada, es decir, que las células se encuentren en confluencia y sin presentar ninguna discontinuidad. Como método de evaluación de la formación de la monocapa se realizaron medidas de la resistencia eléctrica transepitelial durante la evolución de las mismas (Castillo y col., 2006). Una vez que dicho valor se

mantiene constante, la monocapa se ha formado y se puede comenzar con el ensayo de medición de la actividad transportadora.

Recordemos que para estos ensayos se sembraron 1×10^5 células Caco2-TC7/cm² en insertos de poliéster de 12 mm de diámetro y se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) luego de cada cambio de medio. En la *Figura III. 13* se puede observar como varía el valor de la TEER durante la incubación hasta alcanzar un valor máximo aproximado de 350 Ω luego de 12 días. Las distintas muestras (1 a 6) corresponden a distintos insertos en los cuales se sembró la misma cantidad de células el mismo día y a partir de un único tripsinado, todas incubadas y crecidas dentro de una misma placa. La *Figura III. 13* representa sólo un ejemplo de los diversos ensayos de medida de la TEER realizados, evidenciándose comportamientos muy similares en todos los casos.

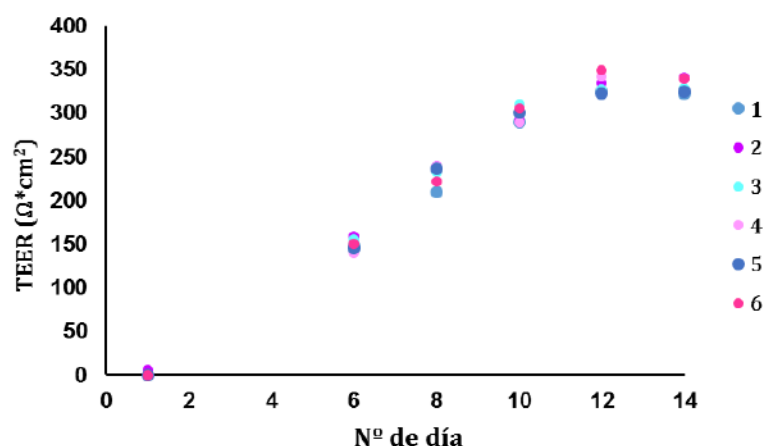


Figura III. 13.- Variación de la resistencia eléctrica transepitelial durante la incubación de células Caco2-TC7 sobre insertos de poliéster.

III. 10.- Ensayos de citotoxicidad.

Dada la necesidad de acotar la cantidad de muestras a evaluar en los ensayos de absorción, se eligieron dos fracciones de cada una de las muestras que cumplieran con el requisito de presentar una elevada actividad en ambos ensayos, ORAC y HORAC (*Figuras III. 11 y III. 12*). De esta manera, se seleccionaron las fracciones 50 y 52 de *AisDIG*, y las 52 y 57 de *HalcDIG*, a partir de ahora denominadas *AD50*, *AD52*, *HD52* y *HD57*. En la *Tabla III. 3* se puede observar el rango de masas moleculares presente en cada una de ellas de acuerdo con la curva de calibración correspondiente. Las mismas (0,7 – 1,8 kDa) corresponderían a péptidos de entre 6 y 16 aminoácidos.

Tabla III. 3.- Rango de masas moleculares de las fracciones seleccionadas para realizar los ensayos de absorción intestinal.

Muestra	Masas moleculares (kDa)
AD50	1,6 – 1,8
AD52	1,3 – 1,4
HD52	1,3 – 1,4
HD57	0,7 – 0,8

Antes de realizar los ensayos de evaluación de la absorción intestinal, se realizaron dos ensayos de citotoxicidad, MTT y Rojo Neutro, a fin de asegurar que las muestras no resultaran dañinas para las células en estudio. Como se puede observar en la *Figura III. 14*, las muestras ensayadas no fueron citotóxicas en las concentraciones en las que se utilizaron, dado que las células luego del tratamiento con las muestras, mantuvieron en todos los casos una completa funcionalidad mitocondrial (MTT) y lisosomal (Rojo Neutro). Si bien se realizaron dos experiencias independientes de evaluación de la citotoxicidad para cada uno de los ensayos, en la *Figura III. 14* se pueden apreciar los resultados de ambas en conjunto.

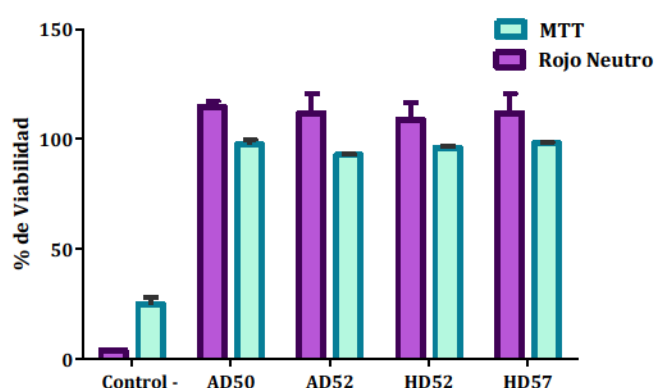


Figura III. 14.- Resultados de los ensayos de citotoxicidad: MTT y Rojo Neutro.

Los resultados se expresan como el promedio \pm SD ($n = 4$)

III. 11.- Simulación de la absorción intestinal.

Se realizaron los ensayos de absorción, una vez que se comprobó que las muestras no resultaron citotóxicas. Para lo cual se incubaron las monocapas confluentes de células Caco2-TC7, crecidas sobre los insertos de poliéster, con las muestras ‘sembradas’ en la cámara apical, durante 3 horas a 37 °C con un 5 % de CO₂. Luego, se tomó el contenido de cada una de las cámaras, apical y basolateral, para su análisis junto con la muestra original correspondiente.

III. 11. a. - Cuantificación de proteínas.

Como una primera medida de evaluación de la absorción de péptidos, se analizó la concentración de compuestos de naturaleza proteica en cada una de las fracciones (muestra original, cámara apical y cámara basolateral), calculando la masa total de proteína en las mismas. Los resultados se muestran en la *Tabla III. 4.*

Tabla III. 4.- Cuantificación de proteínas (μg) en las muestras originales y en las fracciones apical y basolateral de los ensayos de absorción.

Muestra	ORIGINAL	APICAL	BASOLATERAL
AD50	64 ± 1	60 ± 2	48 ± 5
AD52	11 ± 2	6 ± 2	10 ± 3
HD52	17 ± 2	8 ± 1	19 ± 1
HD57	56 ± 1	36 ± 1	34 ± 2

Los resultados se expresan como el promedio ± SD (n =2)

En todos los casos, la masa de péptidos detectada en la cámara apical, luego de la incubación, es menor que la detectada para la muestra original (*Tabla III. 4*), sugiriendo que una parte de los péptidos ingresó a las células, pudiendo o no alcanzar la cámara basolateral. Todas las cámaras basolaterales presentaron un nivel detectable de péptidos (*Tabla III. 4*), lo cual sugeriría que en todos los casos ocurrió absorción de péptidos. Sin embargo, cabe aclarar que los niveles de absorción (calculados como la proporción de péptidos en la cámara basolateral respecto a la muestra original) resultaron altos (superiores al 50 % en todos los casos) respecto a lo esperado según los datos de la literatura. Además, la suma de las masas de péptidos de las dos cámaras superó en todos

los casos la masa en la muestra original (incrementos entre 23 y 70 %). Estos hechos sugieren que las cantidades de péptidos detectadas podrían contener un aporte de componentes ajenos a las muestras, probablemente procedentes de las células. En este sentido, se ha demostrado que monocapas de células Caco-2 crecidas sobre membranas semiporosas e incubadas (4 - 6 horas) en presencia de metionina marcada radiativamente, liberan moléculas proteicas tales como apolipoproteínas, transferrina y factor de crecimiento entre otras, preferencialmente en la cámara basolateral, sin necesidad de señales específicas (Rindler y Traber, 1988). En función de esta información, sería posible que en el presente estudio haya ocurrido secreción de alguna proteína celular a la cámara basolateral y por eso la suma de los valores de ambas cámaras, sea superior a la de la muestra original.

III. 11. b.- Comparación de los perfiles cromatográficos (RP-HPLC)

Se analizaron mediante RP-HPLC tanto las muestras originales, como el buffer en el que se encontraban solubilizadas las mismas, los contenidos de las cámaras apical y basolateral luego de la incubación y el PBS que se adicionó al inicio de la incubación en la cámara basolateral, a fin de evidenciar el pasaje de componentes peptídicos así como su posible modificación por acción del contacto con las células. Las *Figuras III. 15, 16, 17 y 18* muestran los perfiles cromatográficos correspondientes a AD50, AD52, HD52 y HD57 respectivamente. Cabe recordar que, en todos los casos, la cámara basolateral presenta un efecto de dilución respecto a la cámara apical dado que los volúmenes colocados en cada una fueron diferentes (200 µl de muestra en la apical y 600 µL de PBS en la basolateral).

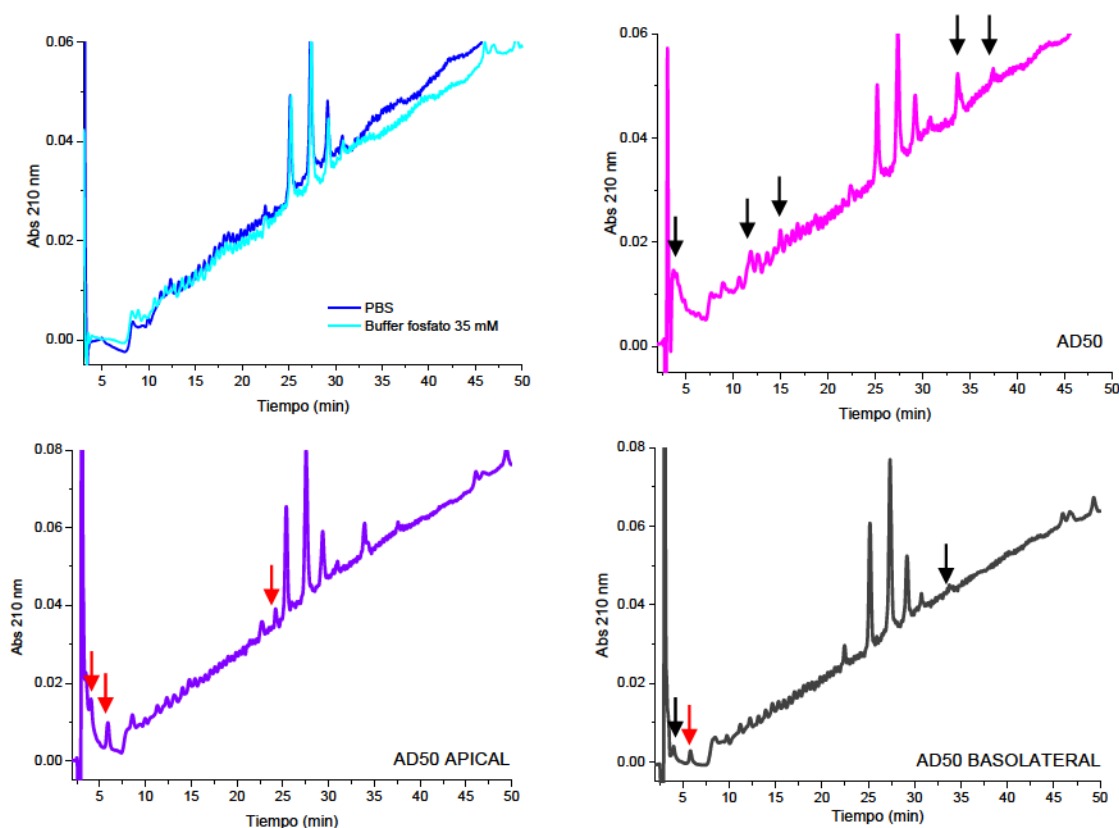


Figura III. 15.- Cromatogramas RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de AD50.

La fracción AD50 presentó una diversidad de moléculas con diferentes t_R (Figura III. 15). Descartando aquellos picos correspondientes al buffer, pueden mencionarse tres grupos de componentes: 1) moléculas que aparecen entre los 3,5 y 7 minutos (hidrofílicas), 2) moléculas que aparecen entre los 12 y 15 minutos (picos muy pequeños), 3) moléculas que aparecen entre los 33 y 40 minutos (las más hidrofóbicas). El perfil RP-HPLC de la cámara apical presentó algunos cambios respecto al de AD50, tales como modificaciones en el primer grupo al inicio del cromatograma, disminución de los picos con t_R entre 12 y 15 minutos, y la aparición de dos picos pequeños, uno con $t_R = 6$ minutos y otro con $t_R = 24$ minutos (Figura III. 15, flechas rojas), sugiriendo que sus componentes podrían haber sido generados por acción de las peptidasas celulares sobre péptidos originalmente presentes en AD50. El perfil cromatográfico de la cámara basolateral muestra la aparición de moléculas muy hidrofílicas (t_R entre 3 y 5 minutos) y del pico a $t_R = 34$ minutos (Figura III. 15, flechas negras), presentes tanto en AD50 como en AD50 APICAL, lo cual indicaría que los componentes de estos picos podrían haber sido parcialmente absorbidos sin modificaciones por parte de las células, aunque no se pueda asegurar que las moléculas

constituyentes sean las mismas en las diferentes muestras. También apareció el pico de $t_R = 6$ minutos generado en AD50 APICAL (flecha roja).

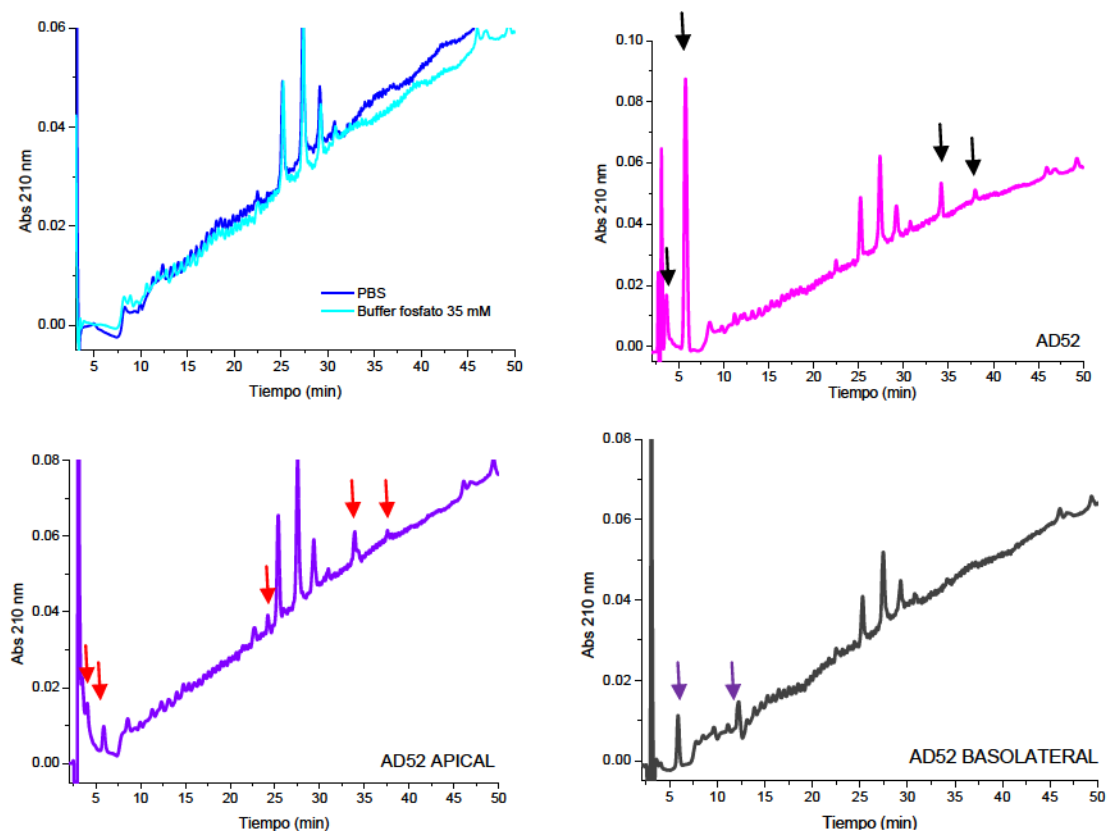


Figura III. 16.- Cromatogramas RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de AD52.

La fracción AD52 presentó un perfil cromatográfico diferente al descrito anteriormente para AD50, mostrando la presencia de moléculas hidrofílicas con t_R menores a 4 minutos y un pico muy importante a $t_R = 6$ minutos. Asimismo, presentó picos correspondientes a moléculas más hidrofóbicas similares a los detectados en AD50 (34 y 38 minutos) (*Figura III. 16*, flechas negras). En la cámara apical se detectaron modificaciones en los picos al inicio del cromatograma ($t_R < 4$ minutos), una muy importante disminución en el pico de $t_R = 6$ minutos y una pequeña disminución de las especies más hidrofóbicas. También se registró la aparición de un pico con $t_R = 24$ minutos (*Figura III. 16*, flechas rojas). La cámara basolateral presentó solamente el pico correspondiente a $t_R = 6$ minutos así como también un pico con $t_R = 13$ minutos, el cual no fue detectado en la cámara apical (*Figura III. 16*, flechas violeta). Sus componentes podrían provenir de la modificación por peptidasas de moléculas originalmente presentes y que habrían sido absorbidos en alta proporción.

Aunque no podemos descartar que se trate de alguna proteína secretada por las propias células a la cámara basolateral.

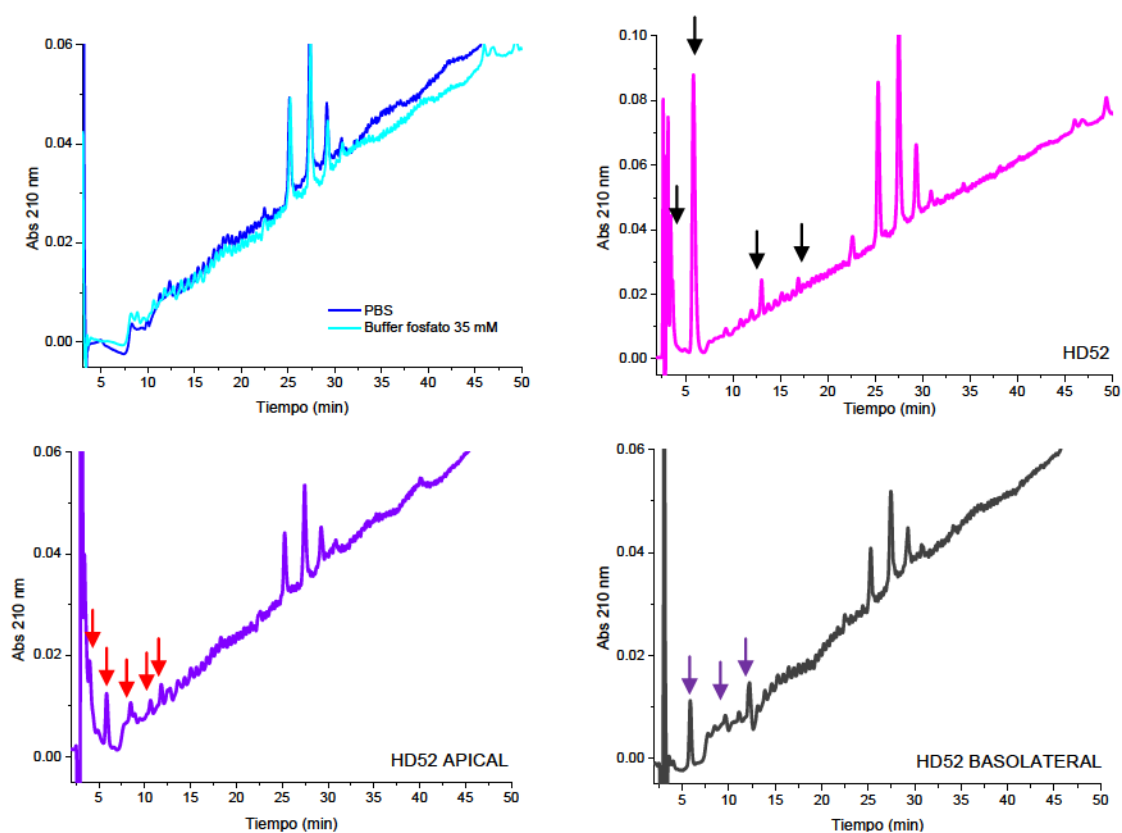


Figura III. 17.- Cromatogramas RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HD52.

También fueron analizadas fracciones provenientes del digerido previamente hidrolizado con alcalasa. La fracción HD52 presentó algunas similitudes con la fracción AD52, tales como picos a tiempos menores a 4 minutos y un pico muy importante a $t_R = 6$ minutos, aunque en este caso también se registraron picos a $t_R = 13$ y 17 minutos, sin presencia detectable de los picos correspondientes a moléculas más hidrofóbicas (*Figura III. 17*, flechas negras). Luego de la incubación con las células, la cámara apical presentó modificaciones en los picos al inicio del cromatograma, así como una disminución importante en la intensidad de los picos a $t_R = 6$ y 13 minutos, la desaparición del pico a $t_R = 17$ minutos y la aparición de pequeños picos entre los 8 y 12 minutos (*Figura III. 17*, flechas rojas). El perfil RP-HPLC de la cámara basolateral indica que se habrían absorbido componentes correspondientes a picos de $t_R = 6$, 10 y 13 minutos (*Figura III. 17*, flechas violeta).

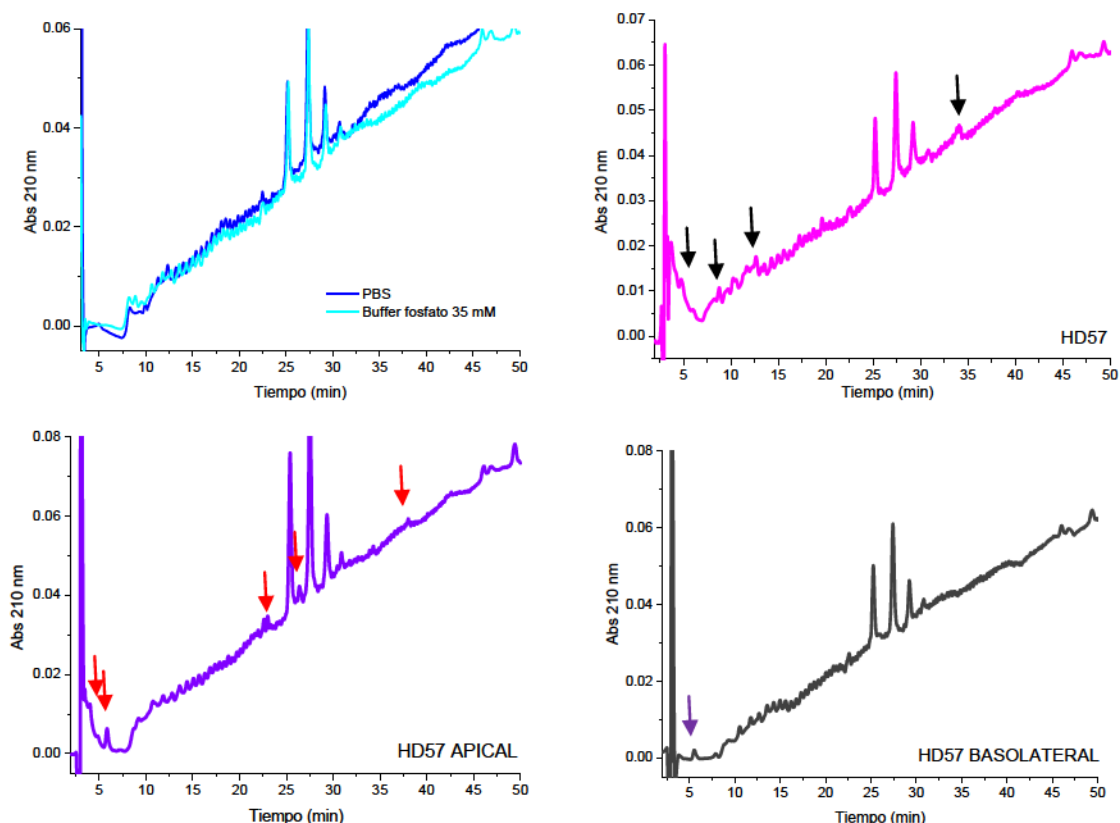


Figura III. 18.- Cromatogramas RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HD57.

Finalmente, la fracción HD57 presentó moléculas hidrofílicas con t_R menores a 5 minutos, unos picos muy pequeños con tiempos entre 8 y 13 minutos y un pico con $t_R = 34$ minutos (*Figura III. 18*, flechas negras). La cámara apical correspondiente presentó una disminución de todos los picos observados en la muestra original y la aparición de picos a $t_R = 6, 23$ y 26 minutos (*Figura III. 18*, flechas rojas), los cuales podrían ser atribuidos a la acción de peptidasas celulares sobre péptidos originales. La cámara basolateral presentó sólo un pico detectable con $t_R = 6$ minutos (*Figura III. 18*, flecha violeta).

Cabe mencionar que dadas las pequeñas cantidades de péptidos/proteínas con las que se trabajó, no se puede descartar la presencia en las muestras de moléculas que no pudieron ser detectadas en estos análisis de RP-HPLC.

Si bien, como se describió en la sección anterior, la determinación de componentes peptídicos por el método de Lowry dio indicios de una posible secreción de proteínas celulares en la cámara basolateral, el análisis RP-HPLC de dichas cámaras no permite corroborar este hecho. En el caso de ocurrir esta secreción, se esperaría la aparición en

todas las cámaras basolaterales de nuevos picos, los cuáles no estarían presentes en la cámara apical. Dado que esto no fue observado en los presentes cromatogramas, no se puede confirmar una secreción de proteínas celulares.

En función de los resultados encontrados mediante los análisis de RP-HPLC y aunque cada una de las muestras tuvo un comportamiento particular, se pueden extraer algunas características comunes a todas ellas:

- Aunque con diferente perfil, todas las muestras presentaron un grupo de moléculas muy hidrofílicas (inicio de los cromatogramas), las cuales sufrieron modificaciones y/o absorción luego de la incubación con la monocapa de células Caco2-TC7.
- Todas las cámaras apicales presentaron la aparición de algún/os pico/s no presente/s en las correspondientes muestras originales, posiblemente relacionados con la aparición de nuevos péptidos producto de la hidrólisis por parte de peptidasas celulares del borde en cepillo.
- En todos los casos se observó absorción de componentes que aparecen a tiempos de elución menores a los 15 minutos.

III. 11. c.- Ensayo ORAC.

Dado nuestro interés en evaluar la posible absorción de péptidos con actividad antioxidante, resulta importante analizar si los componentes absorbidos presentan actividad. En función de ello, se analizó la actividad antioxidante de las cámaras apical y basolateral en comparación con sus correspondientes muestras originales a través del ensayo ORAC. En este caso los resultados se expresan como actividad específica (μg de Trolox/ μg de péptidos) a fin de poder realizar la comparación entre las distintas muestras (*Tabla III. 5*).

En primer lugar, es importante remarcar que la actividad específica de las distintas muestras originales fue diferente, dado que, si bien la actividad absoluta de las mismas había presentado valores bastante cercanos (ver *Figuras III. 11 y III. 12*), la cantidad de componentes peptídicos detectados en cada caso es diferente (ver *Tabla III. 4*). Así, la actividad específica de las muestras AD52 y HD52 fue aproximadamente 3 veces mayor que la de las muestras AD50 y HD57, indicando la presencia en las primeras de componentes

más activos. Como característica común de las dos primeras muestras puede resaltarse la presencia de un pico muy importante con $t_R = 6$ minutos, no presente en las otras dos muestras (ver Figuras III. 15, 16, 17 y 18).

Tabla III. 5.- Valor ORAC de muestras provenientes de ensayos de absorción.

MUESTRA	$\mu\text{g Trolox}/\mu\text{g proteína}$	% respecto muestra original
AD50	$0,09 \pm 0,01^a$	
AD50 APICAL	$0,11 \pm 0,01^a$	119
AD50 BASOLATERAL	$0,13 \pm 0,01^b$	143
AD52	$0,39 \pm 0,03^a$	
AD52 APICAL	$0,58 \pm 0,07^b$	151
AD52 BASOLATERAL	$0,48 \pm 0,02^c$	126
HD52	$0,32 \pm 0,01^a$	
HD52 APICAL	$0,60 \pm 0,03^b$	184
HD52 BASOLATERAL	$0,15 \pm 0,01^c$	47
HD57	$0,10 \pm 0,01^a$	
HD57 APICAL	$0,15 \pm 0,01^b$	143
HD57 BASOLATERAL	$0,23 \pm 0,08^c$	223

Los resultados se expresan como el promedio \pm SD ($n = 3$).

Por otra parte, luego de la incubación en presencia de las células Caco2-TC7, la actividad de todas las muestras en la cámara apical se vio aumentada. Sin embargo, pueden describirse distintos comportamientos para cada muestra respecto a la cámara basolateral.

En el caso de AD50, la cámara basolateral presentó una mayor actividad específica respecto a la muestra original e incluso respecto a la cámara apical (Tabla III. 5), indicando que los productos resultantes de las modificaciones (hidrólisis) producidas por las peptidasas

celulares fueron beneficiosas, generando componentes más activos, y que lograron absorberse moléculas con alta actividad.

En el caso de la muestra AD52, si bien había presentado un mayor aumento de actividad específica ORAC en la cámara apical, la cámara basolateral presentó una actividad algo menor que esta (aunque mayor que la de la muestra original) (*Tabla III. 5*), sugiriendo que si bien se generaron componentes más activos por acción de las células, estos no lograron ser completamente absorbidos.

La muestra HD52 fue la menos favorable desde el punto de vista de la absorción de componentes antioxidantes, ya que si bien se produjo un importante incremento de actividad en la cámara apical, la actividad específica de la cámara basolateral fue del 47 % respecto a la de la muestra original (*Tabla III. 5*).

Finalmente, en el caso de la muestra HD57, el comportamiento fue similar al de la muestra AD50, ya que se observó un aumento de actividad específica de la cámara basolateral respecto a la apical, aunque en este caso mayor que en AD50 (*Tabla III. 5*). Como característica común de las fracciones AD50 y HD57 puede mencionarse la presencia en ambas de moléculas con altos t_R (más hidrofóbicas), no detectadas en las otras muestras.

Si bien, como ya se ha mencionado, no podemos descartar completamente la presencia en las cámaras basolaterales de alguna/s proteína/s secretadas/s por las células, los diferentes comportamientos frente a la actividad antioxidante de cada muestra dan un indicio de su relación con las diferentes moléculas que pudieron ser absorbidas en cada caso.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos concluir que se han logrado identificar diversas fracciones dentro de ambos digeridos que presentaron elevada actividad antioxidante por los métodos ensayados (ORAC y HORAC). Las cuales presentaron componentes con masas moleculares entre 0,7 y 1,8 kDa (6 a 16 aminoácidos).

En concordancia con el capítulo anterior de este trabajo, la hidrólisis previa con alcalasa no favorecería la liberación de una mayor cantidad/calidad de péptidos antioxidantes, dado que no se detectaron fracciones sobresalientes en *HalcdIG* respecto de *AisdIG*.

Al evaluar la absorción intestinal de algunas de las fracciones más activas por ambos métodos, pudo concluirse que ciertos péptidos podrían ser absorbidos a través de la monocapa de células Caco2-TC7, previa modificación o no por parte de las peptidasas celulares. Resulta interesante comparar lo ocurrido en cada una de las fracciones ya que las cuatro muestras analizadas presentaron comportamientos diferentes en relación a su actividad antioxidante. Si bien en todos los casos el potencial antioxidante aumentó (en la cámara apical) debido a la acción de las peptidasas del borde en cepillo, el comportamiento luego de la absorción fue variable, dependiendo del tipo de moléculas que logró atravesar en cada caso la monocapa celular.

Estos estudios constituyen una primera aproximación a la evaluación de la absorción de péptidos con capacidad antioxidante derivados de proteínas de amaranto. Los resultados son prometedores ya que sugieren una potencial absorción de componentes antioxidantes, lo cual posibilitaría su acción en sistemas blanco en el interior del organismo. Estudios preliminares tendientes a identificar los péptidos absorbidos han mostrado indicios de secuencias provenientes de proteínas de amaranto capaces de atravesar la monocapa celular, aunque los mismos no son aun concluyentes. Serán necesarios estudios futuros complementarios para profundizar el análisis de los mecanismos de absorción y completar la identificación de los péptidos absorbidos y su relación con la actividad antioxidante.

CAPITULO IV

*Identificación y caracterización de
péptidos antioxidantes de amaranto.*

Como ya se ha mencionado en los capítulos anteriores, existen actualmente numerosos estudios que demuestran que la hidrólisis de diversas proteínas de origen alimentario puede liberar péptidos con distintas actividades biológicas, tales como antihipertensivos, anticoagulantes, inmunomoduladores y antioxidantes, entre otros (Hartmann y Meisel, 2007; Sun y col., 2009; Udenigwe y Aluko, 2011). Se ha demostrado incluso que algunos péptidos presentan más de una actividad (Meisel y FitzGerald, 2003). Los péptidos pueden ser generados en el tracto digestivo, debido a la hidrólisis de las proteínas de la dieta por las enzimas gastrointestinales, con la posibilidad de que expresen su actividad biológica en el organismo. Algunos de ellos han demostrado poseer un efecto beneficioso *in vivo* luego de ser administrados por vía oral (Sun y col., 2009), lo cual sugiere que algunos oligopéptidos fisiológicamente activos podrían ser absorbidos a través del epitelio intestinal, reteniendo su estructura y actividad intactas. Este posible rol fisiológico de péptidos derivados de proteínas de amaranto fue estudiado en los capítulos anteriores del presente trabajo.

Si bien tradicionalmente sólo se consideraban a las proteínas de la dieta como una fuente de energía y de aminoácidos esenciales, en la actualidad ha surgido un creciente interés por la identificación y caracterización de diversos péptidos bioactivos de fuentes de origen animal y vegetal. Poder determinar cuál es la composición de los péptidos en estudio, resulta un desafío sumamente importante, dado que en los últimos años se ha demostrado que existe una estrecha relación entre la estructura y la actividad de los mismos (Chen y col., 1998; Philanto-Leppala, 2000). La literatura muestra numerosas publicaciones en las que se realizan estudios sobre péptidos de origen alimentario con actividad antioxidante, a través de las cuales se han podido establecer diversas conclusiones respecto a dicha relación (Sarmadi e Ismail, 2010). Se ha demostrado que la presencia de ciertos aminoácidos en los péptidos, tales como la histidina, cisteína, prolina, metionina, lisina y los aminoácidos aromáticos, estaría relacionada con la actividad antioxidante de los mismos a través de diferentes mecanismos (Wang y De Mejia, 2005). En muchos casos se ha observado que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos (prolina y leucina) en el extremo N-terminal potenciaría la actividad antioxidante de los péptidos. Chen y col. (1998) postularon que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos podría mejorar la accesibilidad

de péptidos antioxidantes en ciertos sitios celulares como las cadenas poliinsaturadas de ácidos grasos de las membranas biológicas. Saito y col. (2003) por su parte, han realizado series de combinatorias de tripéptidos, demostrando que cualquier cambio en la secuencia de aminoácidos de un tripéptido influirá directamente sobre la actividad antioxidante del mismo; demostrándose que la formación de péptidos puede actuar tanto de manera sinérgica como antagónica, respecto a la actividad antioxidante de los aminoácidos por separado (Hernández-Ledesma y col., 2005). Por otra parte, también se ha postulado y evidenciado, que los aminoácidos aromáticos, tirosina, fenilalanina y triptofano podrían actuar donando protones a los radicales libres o favoreciendo la quelación de metales que, en muchos casos, actúan como pro-oxidantes. Además, los grupos sulfhidrilo de la cisteína también podrían actuar secuestrando radicales libres. Sarmadi e Ismail (2010) y Udenigwe y Aluko (2011) han realizado numerosas revisiones sobre la información disponible acerca de los péptidos antioxidantes y sus mecanismos de acción.

Si bien existen muchos estudios, resulta imposible deducir y confirmar cuál será el comportamiento de péptidos conformados por 4 aminoácidos o más, debido a la gran cantidad de información necesaria y lo costoso que resulta realizar diversos ensayos para la identificación y evaluación de la actividad para cada péptido. Es por eso que se han desarrollado modelos teóricos que surgen como una herramienta muy útil para el análisis de las relaciones estructura/actividad de los péptidos. Uno de los modelos matemáticos más utilizado es el modelo cuantitativo QSAR (quantitative structure-activity relationship) (Li y Li, 2013). Dicho modelo proporciona relaciones matemáticas que permiten expresar la relación entre la estructura y la actividad de los péptidos a partir de datos encontrados en estudios previos en la literatura, y puede ser utilizado para estimar o predecir la actividad biológica de un determinado compuesto en relación con su estructura química. Este modelo asume principalmente que la actividad biológica está relacionada con propiedades estructurales como son los atributos electrónicos, la hidrofobicidad y la estericidad (Hansch y Leo, 1995; King y col., 1993).

En los estudios realizados en los CAPÍTULOS I y II se ha demostrado que la digestión gastrointestinal simulada del aislado proteico de amaranto produciría la liberación de péptidos antioxidantes. También se ha demostrado la capacidad que tienen los productos de la digestión gastrointestinal de actuar frente a diversas especies reactivas normalmente presentes en nuestro organismo, especialmente frente al peroxinitrito y a los radicales

peroxilo e hidroxilo. Asimismo, pudo comprobarse que una hidrólisis con alcalasa previa a la digestión gastrointestinal no mejoraría dichas propiedades.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, resulta interesante profundizar el estudio de los péptidos antioxidantes de amaranto generados por digestión gastrointestinal, investigando la identidad de los mismos, así como también la relación existente entre su estructura y actividad.

OBJETIVO GENERAL.

Identificar péptidos generados por la digestión gastrointestinal de proteínas de amaranto con potencial actividad antioxidante.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- » Separar por RP-HPLC fracciones de *Ais* y *AisDIG* e identificar aquellas con mayor actividad antioxidante.
- » Obtener la secuencia de los péptidos constituyentes de las fracciones con mayor actividad por espectrometría de masas.
- » Seleccionar secuencias potencialmente antioxidantes a través del análisis de relaciones estructura/actividad y haciendo uso de modelos teóricos, y obtener dichos péptidos por síntesis.
- » Confirmar la actividad antioxidante de los péptidos sintetizados mediante el ensayo ORAC.

IV. 1.- Muestras utilizadas.

Se utilizaron las fracciones solubles del aislado proteico y de su correspondiente digerido gastrointestinal (*Ais* y *AisDIG*), obtenidas bajo las condiciones descriptas anteriormente en la *Sección I. 15*.

IV. 2.- Separación de fracciones por RP-HPLC preparativa.

Se realizó una separación por RP-HPLC de fracciones de *Ais* y *AisDIG*. Para ello, se utilizó una columna preparativa SunFire C8 ST 10/250, con partículas de 5 µm de diámetro (Waters) en un sistema de HPLC Waters (Waters Corp., Milford, MA) equipado con un detector de arreglo de diodo (DAD). Para la corrida se utilizó una elución en gradiente utilizando dos solventes: el solvente A fue una mezcla de agua y acetonitrilo (98:2) con ácido trifluoroacético TFA (650 µl/l), mientras que el solvente B estuvo compuesto por una mezcla de agua y acetonitrilo (35:65) con TFA (650 µl/l). Las muestras fueron eluidas con un gradiente lineal del solvente B en A (0 a 100% en 55 minutos, con un flujo de 5,2 ml/minuto). La separación se llevó a cabo a 40 °C y la detección se realizó a 210 y 280 nm, colectando fracciones cada 0,6 minutos. Aquellas fracciones en las que se observó aparición de picos, fueron congeladas a -80°C y luego liofilizadas.

IV. 3.- Ensayo ORAC sobre fracciones.

Las fracciones liofilizadas fueron resuspendidas en 100 µl de buffer fosfato 35 mM, (pH = 7,8) y la capacidad antioxidante de las mismas fue evaluada a través del protocolo descrito anteriormente en la *Sección II.2*. En cada caso, con el valor del % de inhibición se calculó el valor de Trolox equivalente TE (µM) a partir de la correspondiente curva de calibración (6,75 a 100 µM de Trolox).

IV. 4.- Secuenciación de péptidos por espectrometría de masas.

Fundamento.

Se utilizó un sistema de separación nanoLC, el cual se ha sido diseñado para optimizar las separaciones de bajo flujo y facilitar el acoplamiento con espectrometría de masas. Además, proporciona una buena resolución, sensibilidad, selectividad y repetitividad para aplicaciones nano de cromatografía líquida y proteómica. La técnica generalmente consiste en la utilización de columnas con un diámetro interno de 75 micras y bajas tasas de flujo de alrededor de 300 nl/minuto. Estas configuraciones son ideales para el análisis de aquellas muestras con las que se cuenta con poca cantidad de partida, debido a la mejora de la sensibilidad de la columna.

Dicho sistema estuvo acoplado a un espectrómetro de masas, el cual permite realizar un análisis cualitativo, para la determinación de estructuras orgánicas por sí sola o por combinación con otras técnicas espectrofotométricas. La técnica se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos los iones, los mismos son diferenciados por un analizador de acuerdo con su masa y su carga y finalmente se detectan en un dispositivo adecuado. En este caso, la *técnica de ionización* que se utilizó fue la ionización por electrospray (ESI) en la cual se introduce el analito (que será ionizado) disuelto en un solvente más volátil por un capilar de metal muy pequeño y cargado, en flujo continuo, en una región donde se aplica un alto campo eléctrico y se genera una familia de iones moleculares policargados. Debido a la repulsión de las cargas eléctricas, el líquido que sale del capilar, forma un aerosol, una nube de pequeñas gotas (10 μm) altamente cargadas. Conforme el solvente se evapora, las moléculas de analito se aproximan, se repelen y finalmente, cuando la repulsión de las cargas positivas vence la tensión superficial, estallan las gotas. El proceso se repite hasta que el analito está libre de solvente, de modo que no quedan más que iones y éstos se mueven hacia el analizador de masa.

El equipo utilizado para la realización de este trabajo fue un LTQ Orbitrap Velos, el cual consiste de cuatro partes principales (*Figura IV. 1*): 1) una trampa de iones lineal (Thermo Scientific LTQ Velos) para la ionización, selección y fragmentación de la muestra; 2) un dispositivo de almacenamiento intermedio (trampa lineal curvada) necesario para la inyección de pequeños pulsos; 3) un analizador Orbitrap para el análisis basado en la transformación de Fourier; 4) una celda de colisión de alta energía.

([http://sisupport.thermofinnigan.com/techpubs/manuals/LTQ-Orbitrap-Velos Hardware.pdf](http://sisupport.thermofinnigan.com/techpubs/manuals/LTQ-Orbitrap-Velos-Hardware.pdf))

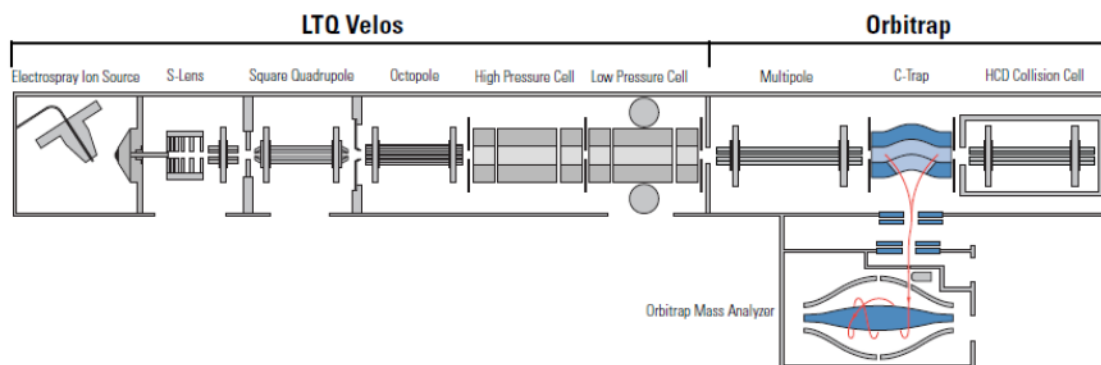


Figura IV. 1.- Diagrama esquemático de un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos

El *analizador de masas ORBITRAP* es una modificación del analizador de trampa de iones. Se compone de un electrodo central rodeado por un par de electrodos externos en forma de campana. Utiliza el mismo principio de funcionamiento que se basa en la utilización de una zona de confinamiento electromagnética generada por medio de dos señales de radiofrecuencia. Durante el análisis de masas se aplica entre los electrodos superior e inferior un cierto potencial de radiofrecuencia, mientras que al mismo tiempo se aplica sobre el electrodo central otro voltaje de cierta radiofrecuencia y de amplitud variable. Estos dos voltajes de radiofrecuencia dan lugar a un campo electromagnético cuadrupolar tridimensional en el que quedan confinados iones que tendrán una trayectoria oscilante estable, la cual dependerá de los voltajes que se aplican y de la relación m/z del ion. Para poder detectar todos los iones, se altera la señal de radiofrecuencia del electrodo anular, lo que da lugar a la desestabilización de la trayectoria de un ion concreto que es eyectado de la trampa. Un cambio gradual en la amplitud del campo de radiofrecuencia generará que los iones sean eyectados de la trampa en orden creciente de su relación m/z , lo que dará lugar a los espectros de masa.

Procedimiento experimental.

Ciertos picos de las fracciones obtenidas por RP-HPLC y que presentaron elevada actividad antioxidante, fueron analizadas por espectrometría de masas en el laboratorio “Biopolymers - Structural Biology” perteneciente al INRA (Instituto Nacional de Investigación Agronómica), centro Angers-Nantes, Francia.

http://www.angersnantes.inra.fr/plateformes_et_plateaux_techniques/plateforme_bibs).

Las muestras liofilizadas fueron resuspendidas en 30 µl del solvente A (0,1 % de ácido fórmico en agua), diluidas y analizadas por cromatografía líquida de nanoflujo – espectrometría de masas/espectrometría de masas (nanoLC-MS/MS) a través del uso de un sistema nanoLC (RSCL 3000, Dionex) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap VELOS (Thermo-Fisher). La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna capilar de fase reversa de 15 cm (Acclaim Pepmap C18 2-µm 100 A, 75-µm i.d.) aplicando un gradiente de 4 a 50 % del solvente B (90 % de acetonitrilo 0,08 % de ácido fórmico) en el solvente A en 28 minutos, con un flujo de 300 nL/minuto. Para el análisis de la fragmentación de los péptidos (MS/MS) se adquirieron los escaneos MS totales a una resolución de 30,000 (FWMH) usando el analizador Orbitrap (rango m/z: 300-2000) así como los espectros (MS/MS) de disociación inducida por colisión (CID) para los cinco iones más intensos en la trampa LTQ.

Una vez obtenidos los datos, éstos fueron analizados con el software MASCOT 2.2 (Matrix Science) contrastando con la base Uniprot (Universal Protein Resource) restringida a la taxonomía *Amaranthus* (Junio 2013). Los parámetros de búsqueda y los criterios de aceptación utilizados fueron: tolerancia: 5 ppm para iones parentales, 0,5 Da para fragmentos, cargas: +2 y +3, modificaciones: oxidación (M), máximo de cortes ausentes: 1.

Generalmente, con la base de datos Uniprot-Viridiplantae las proteínas son detectadas cuando presentan al menos 2 péptidos con score por arriba del valor umbral para MASCOT (dicho valor es de 39 con Uniprot-Viridiplantae). Dado que el banco de datos utilizado es pequeño, el “match” o coincidencia de una proteína fue considerada válida para aquellas que presentaron al menos un péptido con un ‘buen espectro MS/MS’ estimado a través del estudio manual de los datos. Además, para tener mayor seguridad en la validación de las proteínas identificadas, los resultados de todas las fracciones analizadas fueron combinados para realizar la búsqueda en la base de datos, dado que péptidos provenientes de la misma proteína pueden encontrarse en distintas fracciones cromatográficas.

IV. 5.- Síntesis de péptidos antioxidantes.

Procedimiento experimental.

Conocidas las secuencias de los péptidos detectados en cada fracción y teniendo en cuenta relaciones entre la estructura y la actividad antioxidante previamente informadas en la literatura, se seleccionaron secuencias para ser sintetizadas. Los péptidos fueron sintetizados por Zhejiang Ontores Biotechnologies Co., Ltd (China), con una pureza mayor al 95 % p/p obtenida por un análisis por RP-HPLC (fase móvil: A: 0,1% de TFA en agua, B: 0,1% de TFA en 80% de ACN; gradiente: 17% - 37% de B en 20 minutos; flujo: 1,0 ml/min, columna: Agilent ZORBAX 3005SB-C18 4.6/250mm) y su identidad fue confirmada por espectrometría de masas.

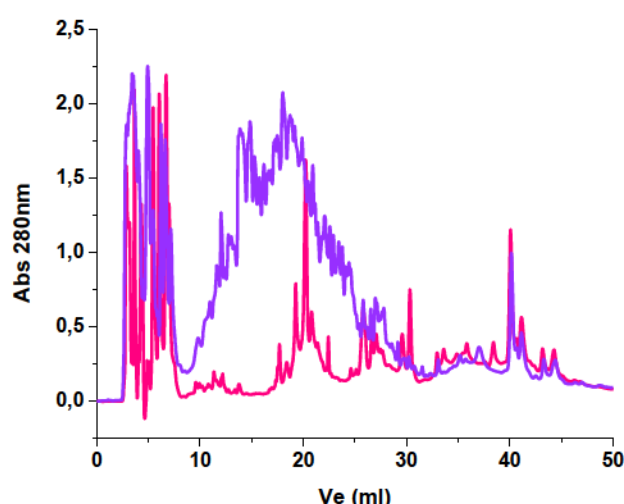
IV. 6.- Ensayo ORAC sobre péptidos sintetizados.

Los péptidos sintetizados y liofilizados fueron solubilizados en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) en una concentración de 1 mg/ml y, a partir de allí, se realizaron las diluciones correspondientes. La capacidad antioxidante de las soluciones resultantes fue evaluada a través del protocolo descrito anteriormente en la *Sección II. 2*. El % de inhibición fue graficado respecto a la concentración utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Las curvas se ajustaron a una regresión lineal o no lineal, según correspondía. La regresión no-lineal se ajustó a una curva dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable) de ecuación: $Y = \text{Valor mínimo} + (\text{Valor máximo} - \text{Valor mínimo}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{pendiente}))}$ donde $X = \text{Log(concentración)}$, $Y = \%$ inhibición del radical. Para poder normalizar las curvas, el valor mínimo fue ajustado a un valor constante e igual a 0, mientras que el valor máximo se ajustó a un valor de 100. A partir de dichos ajustes se obtuvo el valor de la concentración de proteínas necesarias para lograr una inhibición del 50 % (IC₅₀).

IV. 7.- Separación de fracciones por RP-HPLC preparativa.

En esta parte del trabajo, se decidió focalizar el análisis sobre el aislado y su digerido gastrointestinal, dado que a través de los estudios anteriormente realizados se pudo observar que la hidrólisis previa del aislado con alcalasa no mejoraría la actividad antioxidante luego de la digestión gastrointestinal simulada.

Los componentes solubles de las muestras *Ais* y *AisDIG* fueron analizados y separados a través de una columna preparativa C8-RP-HPLC. En la *Figura IV. 2* se presentan los cromatogramas de ambas muestras a 280 nm.



*Figura IV. 2.- Cromatogramas obtenidos por RP-HPLC de *Ais* y *AisDIG*.*

Comparando ambos perfiles se puede observar que luego de la digestión gastrointestinal se han liberado mayormente péptidos con tiempos de retención (t_R) entre los 10 y 30 minutos. Además, se observa la aparición de ciertas moléculas más hidrofílicas, con t_R menores a los 10 minutos, y la desaparición o disminución de ciertas especies más hidrofóbicas, que en *Ais* presentaban valores de t_R entre 30 y 40 minutos (*Figura IV. 2*).

Como se mencionó anteriormente en la *Sección IV. 2*, se colectaron fracciones cada 0,6 minutos desde los 2 hasta los 50 minutos, generando un total de 80 fracciones/corrida. Se realizó una primera selección de fracciones, descartando aquellas en las que el contenido

proteico era muy bajo o no detectable de acuerdo a los cromatogramas obtenidos a 210 y 280 nm.

IV. 8.- Ensayo ORAC sobre fracciones.

Se evaluó la actividad antioxidante de las fracciones previamente seleccionadas por el método ORAC que, como ya se ha demostrado previamente, es un método muy sensible. Para cada fracción se calculó el valor de Trolox equivalente TE (μM). A fin de mostrar de manera más sencilla los resultados obtenidos, los mismos se presentan de manera cualitativa, dividiendo a las muestras en grupos de acuerdo a su nivel de actividad ORAC (*Tabla IV. 1*).

Como puede observarse en la *Tabla IV. 1*, en el caso de *Ais* sólo algunas fracciones presentaron elevada actividad a través de esta metodología: 30, 40, 41, 46, 48, 49, 52, 53, 57, 58, 60, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71 y 72. Casi todas corresponden a tiempos de retención mayores a 25 minutos, sugiriendo que presentan ciertas características hidrofóbicas. Por otra parte, se detectaron varias fracciones que parecerían tener un efecto “pro-oxidante”, dado que en presencia de las mismas se observó un mayor desarrollo de fluoresceína oxidada que frente al correspondiente blanco (buffer fosfato en el que las muestras se encontraban solubilizadas).

En el caso de *AisDIG*, se puede observar que, luego de la digestión gastrointestinal simulada, se han liberado una gran diversidad de péptidos que poseen alta capacidad secuestrante de radicales peroxilo, ya que aparecen muchas fracciones con un elevado valor de Trolox equivalente. Estas fracciones se encuentran entre la 5 y la 49, correspondientes a t_R entre 4,4 y 30 minutos (*Tabla IV. 1*).

Muchas de las fracciones más hidrofóbicas (t_R mayor a 29 minutos) con actividad elevada en el caso de *Ais*, presentaron un comportamiento diferente en *AisDIG*, lo cual coincide con su disminución o desaparición para formar especies más hidrofílicas, tal como se observa en el cromatograma obtenido por RP-HPLC (*Figura IV. 2*).

Tabla IV. 1.- Resultados del ensayo ORAC sobre las fracciones obtenidas por RP-HPLC.

Nº de fracción	t _R (min)	Ais	AisDIG	Nº de fracción	t _R (min)	Ais	AisDIG
2	2,6 – 3,2	+	+	39	24,8 - 25,4	nm	++
3	3,2 – 3,8	-	+	40	25,4 – 26,0	++	++
4	3,8 – 4,4	+	-	41	26,0 – 26,6	++	+++
5	4,4 – 5,0	-	+++	42	26,6 – 27,2	+	+++
6	5,0 – 5,6	-	+++	44	27,8 – 28,4	nm	+++
7	5,6 – 6,2	-	+++	45	28,4 – 29,0	nm	+++
8	6,2 – 6,8	-	-	46	29,0 – 29,6	+++	na
9	6,8 – 7,4	-	-	47	29,6 – 30,2	-	++
10	7,4 – 8,0	-	+++	48	30,2 – 30,8	++	++
11	8,0 – 8,6	-	+++	49	30,8 – 31,4	+++	++
12	8,6 – 9,2	nm	+++	50	31,4 – 32,0	nm	nm
13	9,2 – 9,8	nm	+++	51	32,0 – 32,6	nm	++
14	9,8 – 10,4	-	+++	52	32,6 – 33,2	+++	nm
15	10,4 - 11,0	-	+++	53	33,2 – 33,8	+++	+
16	11,0 – 11,6	+	+++	54	33,8 – 34,4	-	nm
17	11,6 – 12,2	-	+++	55	34,4 – 35,0	na	-
18	12,2 – 12,8	na	+++	56	35,0 – 35,6	+	+
19	12,8 – 13,4	nm	nm	57	35,6 – 36,2	++	+
20	13,4 – 14,0	-	+++	58	36,2 – 36,8	+++	nm
21	14,0 – 14,6	nm	+++	59	36,8 – 37,4	nm	nm
22	14,6 – 15,2	nm	+++	60	37,4 – 38,0	+++	+
23	15,2 – 15,8	nm	+++	61	38,0 – 38,6	+	nm
24	15,8 – 16,4	nm	+++	62	38,6 – 39,2	++	nm
25	16,4 – 17,0	+	+++	63	39,2 – 39,8	-	nm
26	17,0 – 17,6	-	++	64	39,8 – 40,4	-	nm
27	17,6 – 18,2	-	+++	65	40,4 – 41,0	+	nm
28	18,2 – 18,8	-	+++	66	41,0 – 41,6	++	+
29	18,8 – 19,4	+	+++	67	41,6 – 42,2	+++	nm
30	19,4 – 20,0	+++	+++	68	42,2 – 42,8	+++	nm
31	20,0 – 20,6	-	+++	69	42,8 – 43,4	++	nm
32	20,6 – 21,2	nm	+++	70	43,4 – 44,0	+++	nm
33	21,2 – 21,8	nm	+++	71	44,0 – 44,6	+++	nm
34	21,8 – 22,4	-	+++	72	44,6 – 45,2	++	nm

35	22,4 – 23,0	-	+++	73	45,2 - 45,8	nm	nm
36	23,0 – 23,6	na	+++	75	46,4 – 47,0	nm	nm
37	23,6 – 24,2	na	-	76	47,0 - 47,6	nm	
38	24,2 – 24,8	nm	+++				

-	Efecto pro-oxidante.
na	No se ha encontrado actividad.
+	Baja actividad (TE < 150 µM).
++	Actividad intermedia (150 µM < TE < 250 µM).
+++	Actividad elevada (TE > 250 µM).
nm	Actividad no medida

III. 9.- Identificación de fracciones activas por espectrometría de masas.

Dado que uno de los principales objetivos del presente estudio fue identificar la secuencia de ciertos péptidos antioxidantes, encriptados dentro de las proteínas de amaranto, se seleccionaron algunas de las fracciones más activas para ser analizadas por espectrometría de masas utilizando un espectrómetro nanoLC-ESI-ORBITRAP. En el caso de *Ais*, se intentaron identificar las secuencias de los péptidos componentes de cuatro fracciones (30, 48, 53 y 67, *Figura IV. 3*), lo cual no fue posible con la disponibilidad técnica con la que se contaba, dado que sus moléculas constituyentes tenían masas moleculares mayores a 4 kDa y dichos tamaños no pueden ser analizados en el espectrómetro de masas utilizado. Hecho que también fue confirmado mediante el análisis de estas fracciones por espectrometría de masas MALDI utilizando una matriz CHCA MALDI (ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico). Dichos resultados permiten afirmar que ciertos polipéptidos de amaranto, con pesos moleculares mayores a 4 kDa (es decir de 36 aminoácidos o más), serían capaces de secuestrar radicales peroxilo.

Existen antecedentes de proteínas o polipéptidos de cadena larga con actividad antioxidante, entre ellos pueden mencionarse: una proteína de aproximadamente 28 kDa obtenida a partir de extractos acuosos de semillas de Sundakai (*Solanum torvum*) con alta actividad de secuestrante, poder reductor y quelante, protegiendo al ADN de daños producidos por H₂O₂ (Sivapriya y Srinivas, 2007), una proteína de 18 kDa purificada de semillas de *Ginkgo biloba* con capacidad para neutralizar radicales libres y quelar metales (Zhou y col., 2012). Asimismo, no podemos descartar que los polipéptidos antioxidantes de amaranto presentes en *Ais* podrían encontrarse unidos a moléculas antioxidantes que les otorgaran esta actividad tales como compuestos polifenólicos.

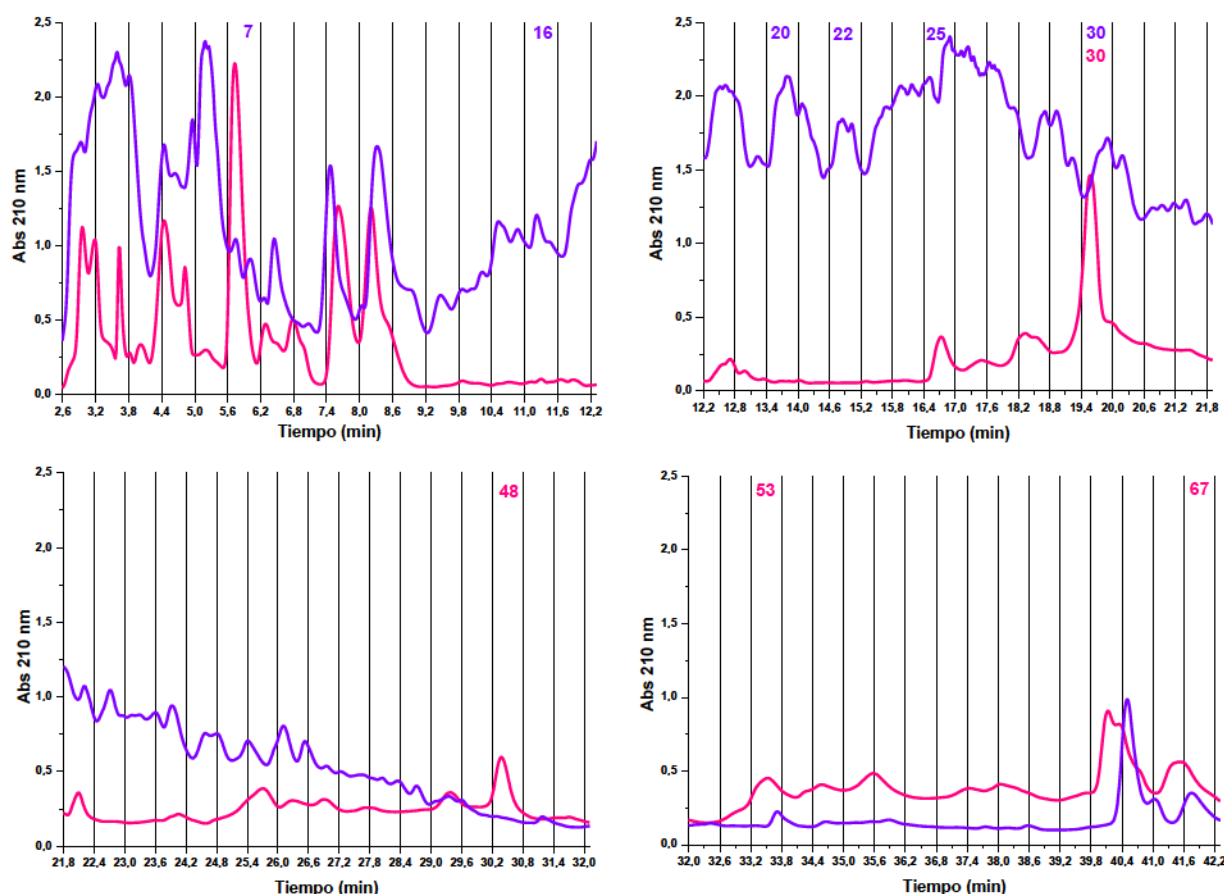


Figura IV. 3.- Cromatogramas obtenidos por RP-HPLC de Ais (•) y AisDIG (•), indicando las fracciones seleccionadas para analizar por espectrometría de masas.

En el caso de AisDIG, se seleccionaron seis fracciones de alta actividad (7, 16, 20, 22, 25 y 30, Figura IV. 3) a fin de identificar sus componentes por espectrometría de masas. Las mismas presentaron componentes con masas moleculares menores a 4 kDa, los cuales pudieron ser detectados mediante el espectrómetro LTQ-ORBITRAP Velos.

Los resultados obtenidos por espectrometría de masas de las 6 fracciones de AisDIG analizadas mostraron que cada una de las muestras estaba compuesta por diversos péptidos provenientes de diferentes proteínas de amaranto, con masas moleculares entre 800 y 1700 Da, lo cual equivaldría a péptidos de entre 7 y 15 aminoácidos (Tabla IV. 3).

Si bien los componentes de la fracción 7 de Ais presentaron un efecto “pro-oxidante” y luego de la digestión gastrointestinal simulada dicha fracción presentó menor absorbancia a 210 nm (Figura IV. 2) y a 280 nm, la actividad antioxidante de la fracción 7 de AisDIG medida por ORAC fue elevada (Tabla IV. 1). En el caso de las fracciones 16, 20 y 22, sus componentes aparecieron principalmente luego de la digestión gastrointestinal (Figura IV.

2), observando un elevado aumento de la actividad de las mismas. Por otro lado, si bien la fracción 25 de *Ais*, que posee un elevado contenido de componentes proteicos, presentó una actividad muy baja, su actividad luego de la digestión aumentó notablemente (fracción 25 de *AisDIG*, *Tabla IV. 1*). Finalmente, en el caso de la fracción 30, la misma ha presentado una actividad elevada en ambos casos (*Tabla IV. 1*). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, no se pudieron detectar péptidos con masas moleculares menores a 4 kDa en el caso de *Ais*, mientras que la fracción 30 de *AisDIG* presentó diversos péptidos con masas de entre 863 y 1034 Da, lo cual indica que si bien ambas fracciones presentan una actividad antioxidante elevada, la composición peptídica/polipeptídica de las mismas, y por lo tanto, los responsables de la actividad antioxidante, no serían los mismos.

Es muy importante destacar, para este análisis, que hasta el momento no todas las secuencias de las proteínas de amaranto son conocidas y se encuentran en las bases de datos de Uniprot consultadas, por lo que no se puede descartar que en cada una de las fracciones antedichas haya presentes otros péptidos correspondientes a proteínas de amaranto aún no secuenciadas. La única proteína de reserva cuya secuencia se encuentra disponible es la globulina 11S. Además se cuenta con las secuencias de inhibidores de tripsina, péptidos antimicrobianos, actina, aglutinina y varias enzimas del metabolismo primario y secundario de amaranto.

<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=amaranthus&columns=id%2centry+name%2creviewed%2cprotein+names%2cgenes%2corganism%2clength&offset=0&sort=score>

Al observar la *Tabla IV. 2*, se puede evidenciar que muchos de los péptidos detectados pertenecen a la globulina 11S, también llamada amarantina, que es la proteína de almacenamiento mayoritaria en las semillas de amaranto. En función de ello, se decidió focalizar el análisis en estos péptidos.

Al analizar y comparar los componentes detectados en las diferentes fracciones de *AisDIG*, especialmente aquellos provenientes de la globulina 11S, se puede observar que hay ciertas secuencias que se solapan parcialmente, esto es, péptidos que provienen de la misma región de la proteína. Es por eso que se decidió agrupar los péptidos en 9 familias de péptidos. En la *Tabla IV. 3*, se pueden observar dichas familias, la composición y masa molecular de los péptidos que las componen, la fracción RP-HPLC en la que fueron detectados y la ubicación de los mismos dentro de la globulina 11S.

Tabla IV. 2.- Péptidos encontrados en cada una de las fracciones analizadas de AisDIG.

Nº de Fracción	Masa experimental	Masa calculada	Secuencia	Proteína de origen
7	821,4285	821,4283	VVSNIYQ	Globulina 11S
	882,3593	882,3607	ESFGVSEE	Globulina 11S
	907,4392	907,4399	ISREEAFG	Globulina 11S
	978,3938	978,3931	TEVWDSNE	Globulina 11S
	990,4408	990,4407	AYNNGDQPL	Globulina 11S
	1019,4299	1019,4308	WEEREQGS	Globulina 11S
	1106,4524	1106,4516	TEVWDSNEQ	Globulina 11S
	1163,5819	1163,5822	IYIEQGNGITG	Globulina 11S
	1294,6229	1294,6227	IYIEQGNGITGM	Globulina 11S
	812,4640	812,4644	DKILDPL	Aglutinina
	814,3817	814,3821	DNLNDPK	Aglutinina
	993,5351	993,5356	STHNGLRPL	Almidón sintasa unida al gránulo
	1017,4958	1017,4978	EEQKGS DIL	Almidón sintasa unida al gránulo
	1228,6113	1228,6088	VQEWNPITDK	Almidón sintasa unida al gránulo
	830,4248	830,4246	RGNKDEI	Cistatina
	888,4300	888,4301	ENREVDK	Proteína de shock térmico en cloroplastos
	1172,5564	1172,5561	DITPDDKQEL	Fosfoenolpiruvato C4 fotosintética
	916,4652	916,4688	LDVLVCNAA	NADPH protoclorofilida oxidoreductasa
16	875,3775	875,3773	WEEREQ	Globulina 11S
	1018,4723	1018,4753	IEQGNGITGM	Globulina 11S
	1129,4890	1129,4901	GDRFQDQHQ	Globulina 11S
	1431,6485	1431,6491	AGKPQQEHSGEHQ	Globulina 11S
	1159,4986	1159,4993	ITASANE PDEN	Aglutinina
	1160,4937	1160,4945	ASANEPDENKS	Aglutinina
	1122,4730	1122,4730	NNNP NFSGPY	Almidón sintasa unida al gránulo
	844,4303	844,4290	NNEDLLK	Enzima málica NAD-dependiente
	830,3911	830,3882	QQAGGENK	Proteína de shock térmico en cloroplastos
	1061,4615	1061,4625	SNDREEIAE	Sacarosa sintasa
20	855,4093	855,4086	NNGDQPLV	Globulina 11S
	893,3864	893,3879	NDQGQSVF	Globulina 11S
	973,4464	973,4465	LQAEQDDR	Globulina 11S
	1544,7336	1544,7332	LAGKPQQEHSGEHQ	Globulina 11S
	890,4740	890,4749	EILYPEK	Almidón sintasa unida al gránulo
	1422,5799	1422,5800	NNNP NFSGPYGEN	Almidón sintasa unida al gránulo
22	802,3102	802,3102	NAMMAPH	Globulina 11S
	1246,5670	1246,5690	AWEEREQGSR	Globulina 11S
	1601,7475	1601,7481	GMRGDRFQDQH QK	Globulina 11S
	1665,7485	1665,7495	AGKPQQEHSGEHQFS	Globulina 11S
	1169,5835	1169,5829	YLAGKPQQEH	Globulina 11S
	833,4124	833,4131	IDTGSKDV	Aglutinina
	916,4978	916,4978	LQSDRVVT	Almidón sintasa unida al gránulo
	939,4279	939,4298	FTTSAERE	Actina
25	869,4608	869,4607	LAGKPQQE	Globulina 11S
	1030,4675	1030,4679	LQAEQDDRG	Globulina 11S
	1386,5901	1386,5953	VSHWAYNNGDQP	Globulina 11S
	1121,5196	1121,5200	AESSQIDTGSK	Aglutinina
	1046,4659	1046,4669	FKHTEDSPS	Cistatina
30	863,4133	863,4137	FNRPETT	Globulina 11S
	866,5338	866,5338	VIKPPSRA	Globulina 11S
	958,4736	958,4720	IVNDQGQSV	Globulina 11S
	1003,5909	1003,5927	HVIKPPSRA	Globulina 11S
	1014,4976	1014,4982	AVNVDDPSKA	Globulina 11S
	991,5074	991,5087	KFNRPETT	Globulina 11S
	1034,4673	1034,4669	GYDNLNDPK	Aglutinina

Tabla IV. 3.- Familias de péptidos obtenidos en AisDIG, derivados de la globulina 11S de amaranto y su localización en dicha proteína.

Familia	Fracción	Secuencia	Mr	Nº de aminoácidos	Localización
1	7	TEVWDSNEQ	1090,4679	9	35-43
		TEVWDSNE	1019,4308	8	35-42
2	7	IYIEQGNGITGM	1294,6227	12	74-86
	7	IYIEQGNGITG	1163,5822	11	74-85
	16	IEQGNGITGM	1018,4753	10	76-86
3	22	GMRGDRFQDQHQK	1601,7481	13	118-130
	16	GDRFQDQHQ	1129,4901	9	121-130
4	22	AGKPQQEHSGEHQFS	16657485	15	184-198
	20	LAGKPQQEHSGEHQ	1544,7332	14	183-196
	22	YLAGKPQQEHSGEH	1579,7379	14	182-195
	16	AGKPQQEHSGEHQ	1431,6491	14	184-196
	22	YLAGKPQQEH	1169,5829	10	182-191
	25	LAGKPQQE	869,4607	8	183-190
5	20	LQAEQDDR	973,4465	8	234-241
	25	LQAEQDDRG	1030,4679	9	234-242
6	30	VIKPPSRA	866,5338	8	251-259
		HVIKPPSRA	1003,5927	9	250-259
7	16	WEEREQ	875,3773	6	261-266
	7	WEEREQGS	1019,4308	8	261-268
	22	AWEEREQGSR	1246,5690	10	260-269
8	30	AVNVDDPSKA	1014,4982	10	288-297
9	30	FNRPETT	863,4137	7	442-448
	22	KFNRPETT	991,5074	8	441-448

IV. 10.- Selección de péptidos potencialmente activos: síntesis y ubicación de los mismos en la globulina 11S.

Los péptidos antioxidantes son péptidos cortos, en general poseen entre 2 y 20 aminoácidos (Chen y col., 1996). Dichos péptidos, provenientes de proteínas alimentarias, son considerados compuestos seguros y saludables de bajo peso molecular, bajo costo de obtención, elevada actividad y fácil absorción. Presentan ciertas ventajas respecto a los sistemas enzimáticos de protección antioxidante, ya que con estructuras más sencillas presentan mayor estabilidad y no presentan riesgos de desarrollar reacciones inmunes peligrosas. Además, presentan propiedades funcionales y nutricionales, más allá de la actividad antioxidante (Hattori y col., 1998; Xie y col., 2008).

Hidrolizados proteicos o péptidos bioactivos de fuentes animales o vegetales han sido foco de numerosos estudios, donde se ha demostrado la relación existente entre la estructura de los mismos y su actividad antioxidante, a través de diferentes mecanismos, ya sea por la inhibición de la peroxidación lipídica (Moure y col., 2006; Qian y col., 2008; Yim y col., 2000), a través del secuestro de radicales (Moure y col., 2006; Qian y col., 2008; Rajapakse

y col., 2005), como quelantes de iones metálicos (Rajapakse y col., 2005) o por proteger a las células del daño que podrían sufrir por la acción de los ROS (Fu y col., 2003). Se han encontrado en digeridos de la β -conglucina de soja seis péptidos antioxidantes (medidos frente a la oxidación del ácido linoleico) los cuales contenían aminoácidos hidrofóbicos tales como la Val y la Leu en el extremo N-terminal, encontrándose también restos de Pro, His o Tyr en dichas secuencias (Chen y col., 1996). Utilizando péptidos sintéticos derivados de Leu-Leu-Pro-His-His, estos autores pudieron demostrar que los segmentos His-His eran importantes para la actividad antioxidante de los péptidos, dado que al hidrolizarlos y quitarles el residuo de His del extremo C-terminal, su actividad disminuía. La delección de la Leu del extremo N-terminal no tenía efecto sobre la actividad antioxidante, siendo los restos de Pro e His importantes para esta función (Chen y col., 1996). Chan y Decker (1994) han demostrado que la His es capaz de quelar metales y secuestrar oxígeno activo y al radical hidroxilo, acción que se le atribuye al grupo imidazol que puede participar en reacciones de transferencia de electrones y de protones. Por otra parte, Hernández-Ledesma y col. (2005) evaluaron la actividad antioxidante por ORAC de cada aminoácido libre, demostrando que Trp, Tyr y Met presentaban las mayores actividades, seguidos de Cys, His y Phe, mientras que el resto de los aminoácidos no presentaron actividad ORAC. La elevada actividad que presentaron el Trp y la Tyr podría explicarse por su capacidad para donar un átomo de hidrógeno; mientras que la Met podría ser oxidada a sulfóxido de metionina y la Cys podría donar el átomo de hidrógeno del grupo sulfhidrilo. Luego de la evaluación de la actividad de diferentes péptidos, dichos autores concluyeron que la composición peptídica podría influir tanto de manera sinérgica como antagónica en comparación con la actividad antioxidante de los aminoácidos libres. En otro trabajo, se evaluaron diversos péptidos de la β -lactoglobulina, también a través del ensayo ORAC, encontrando una elevada actividad en aquellos péptidos que tenían residuos de Trp, Tyr y Met (Hernández-Ledesma y col., 2007). Adicionalmente, los mismos autores demostraron que la presencia de Tyr y Met en el extremo C-terminal, así como la presencia de Trp y Tyr en el extremo N-terminal aumentarían la capacidad antioxidante de los péptidos. En otros estudios ya se había demostrado que la presencia de Tyr en el extremo N-terminal sería uno de los factores determinantes en la actividad antioxidante de péptidos derivados de la ovoalbúmina (Dávalos y col., 2004). Otros autores han demostrado que la presencia de Leu mejoraría la actividad antioxidante de ciertos péptidos hidrolizados de gelatina de calamar (Alemán y col., 2011). Por otro lado, algunos péptidos derivados del colágeno porcino, a

pesar de no poseer residuos de aminoácidos con la capacidad de donar protones, presentaron actividad antioxidante, por ejemplo el péptido Gln-Gly-Ala-Arg (Li y col., 2007). Además, se ha demostrado que péptidos cargados negativamente, con un alto contenido de aminoácidos ácidos, serían resistentes a la digestión gástrica y presentarían un elevado potencial antioxidante (Ao y Li, 2013) y que aminoácidos básicos y ácidos libres también serían responsables de una elevada actividad antioxidante (Saiga y col., 2003; Ao y Li, 2013). Por último, mencionando sólo algunos de los múltiples ejemplos que se encuentran en la literatura, se ha demostrado que dado que la Gly confiere flexibilidad y que la Pro interrumpe la estructura secundaria e impone ciertas restricciones conformacionales en las cadenas polipeptídicas, la presencia de estos dos aminoácidos podría aumentar la disponibilidad de otros residuos aminoacídicos para poder ejercer su poder antioxidante (Alemán y col., 2011).

Como ya se ha mencionado, a pesar de que existen múltiples estudios de investigación referentes a péptidos bioactivos y que se han encontrado ciertas relaciones entre la estructura de los mismos y diversas actividades biológicas, reunir datos experimentales suficientes que avalen las relaciones estructura/actividad de diversos péptidos resulta muy costoso, tal como se indicó previamente, haciéndolo inviable. Es por eso que se ha recurrido al desarrollo de estudios *in silico*, tales como el uso del modelo cuantitativo QSAR (Gu y col., 2011; Li y Li, 2013). En el caso particular de las propiedades antioxidantes, se ha organizado la información disponible en tres bases de datos distintas, de acuerdo al ensayo a través del cual se había estudiado dicha propiedad: ORAC, Trolox equivalente (TEAC = Trolox equivalent antioxidant capacity, obtenido en este caso a través del ensayo del ABTS) y secuestro del radical superóxido (SOR = superoxide radical scavenging). El modelado a través de QSAR ha demostrado una relación entre las propiedades fisicoquímicas en las regiones de los extremos C-terminal y N-terminal y el potencial antioxidante. Las propiedades de la primer región resultan ser más importantes que las de la segunda, siendo la voluminosidad y la hidrofobicidad del aminoácido localizado en el extremo C-terminal una característica muy importante. Además, se ha encontrado que las posiciones más relevantes para los aminoácidos que poseen mayor actividad, para los diferentes ensayos de determinación de la actividad antioxidante fueron distintas: para ORAC: C3>C4>C1>N1>N2, para TEAC: C2>C1 y para SOR: C4>C1>N1. En los tres casos, la localización de aminoácidos voluminosos hidrofóbicos en la región del extremo C-terminal estuvo relacionados con un aumento de la actividad antioxidante. En el caso del ORAC,

tanto aminoácidos polares o cargados en el C1, así como residuos con bajas propiedades electrónicas en los nitrógenos 1 y 2 (N1 y N2), también contribuyeron con el aumento de la actividad (Li y Li, 2013).

Como se mostró anteriormente, la cantidad de péptidos detectados en las fracciones RP-HPLC fue grande. Además, cada fracción estaba constituida por una mezcla de péptidos (*Tabla IV. 2*), algunos de los cuales podrían presentar actividad antioxidante y otros no serían activos. Dado que nuestra intención era poder llegar a conocer al menos algunos péptidos con actividad, siendo económicamente imposible estudiar cada una de las secuencias detectadas, se procedió a la selección de algunos de los péptidos identificados a fin de obtenerlos puros y comprobar su actividad antioxidante. Dicha selección fue realizada en base a la información previamente mencionada sobre las relaciones estructura/actividad, tomando como base las familias de péptidos mostradas en la *Tabla IV. 3*. De esta manera, se decidió seleccionar un péptido representante de cada una de las familias (*Tabla IV. 4*), excepto en el caso de la familia 4 de la cual se eligieron 2 secuencias para ser sintetizadas (secuencias 4 y 5 en la *Tabla IV. 4*). En la *Tabla IV. 4* se muestra, además de la secuencia de los péptidos sintetizados, las fracciones de las cuales provenían (fracciones de origen), la posición que ocupan dentro de la globulina 11S y la longitud y masa molecular de cada uno.

Es importante recordar en este punto algunas propiedades de la globulina 11S, dado que todos los péptidos sintetizados pertenecen a dicha proteína. La misma presenta dos formas hexaméricas heterogéneas, con pesos moleculares entre 300 y 360 kDa en su forma nativa (Marccone, 1999), formadas por subunidades de entre 50 y 70 kDa, cada una de las cuales tiene una subunidad ácida (27 – 37 kDa) y una básica (20 – 24 kDa), unidas entre sí por un enlace disulfuro (A-S-S-B)₆ (Adachi y col., 2001 y 2003; Chen y Paredes López, 1997).

Tabla IV. 4.- Características de los péptidos sintetizados.

	Familia y fracción de origen	Secuencia	Posición en globulina 11S	Longitud	Mr
1	1 – 7	TEVWDSNEQ	35-43	9	1090,4679
2	2 – 7	IYIEQGNGITGM	74-86	12	1294,6227
3	3 – 16	GDRFQDQHQ	118-130	9	1129,4001
4	4 – 20	LAGKPQQEHSGEHQ	183-199	14	1544,7332
5	4 – 22	YLAGKPQQEH	235-242	10	1169,5829
6	5 – 20	LQAEQDDR	235-242	8	973,4465
7	6 – 30	HVIKPPSRA	253-260	9	1003,5927
8	7 – 22	AWEEREQGSR	260-269	10	1246,569
9	8 – 30	AVNVDDPSK	287-297	9	943,459
10	9 – 22	KFNRPETT	441-448	8	991,5074

Rojos: Hidrofóbicos (I, Y, M, L, A, F,W,V)

Celeste: Cargados positivamente (R, H K)

Verdes: Cargados negativamente (D, E)

Violetas-rosa: Polares sin carga (Q, N, S, N, T)

La mayoría de las cadenas peptídicas sintetizadas (1 a 8, *Tabla IV. 4*) pertenecen a la subunidad ácida (Familias 1 a 7), mientras que las dos últimas (9 y 10, *Tabla IV. 4*) pertenecen a los extremos de la subunidad básica. En la *Figura IV. 4*, se encuentran marcados los péptidos sintetizados dentro de la secuencia de la globulina 11S. En negro se muestran los residuos 276-277, N y G, que es el sitio de corte donde se separan los polipéptidos luego del plegado y ensamblado de la estructura cuaternaria de la proteína, correspondiendo el N al extremo C-terminal de la subunidad ácida y el G al extremo N-terminal de la subunidad básica.



Figura IV. 4.- Secuencia de la globulina 11S y posición de cada uno de los péptidos sintetizados.

IV. 11.- Actividad antioxidante de los péptidos sintetizados (ORAC)

Una vez sintetizados los péptidos, se evaluó la actividad antioxidante de los mismos mediante el ensayo ORAC, para comprobar si efectivamente las secuencias seleccionadas poseían dicha propiedad. Los péptidos 6, 9 y 10 no presentaron actividad antioxidante por el método ORAC en el rango de concentraciones ensayadas (hasta 1 mg/ml). Las curvas dosis/respuesta correspondientes al resto de los péptidos sintetizados (1, 2, 3, 4, 5, 7 y 8) se muestran en la *Figura IV.5*, donde se puede observar que no todos los péptidos presentaron el mismo comportamiento, logrando algunos mayores porcentajes de inhibición, con menores concentraciones proteicas. Se observaron claramente dos tendencias de comportamiento de los péptidos en este ensayo. Por un lado los péptidos 1, 2, 5 y 8, con mayor potencial antioxidante, presentaron un comportamiento casi lineal, dosis-respuesta, alcanzando todos una inhibición cercana al 80 %; mientras que los péptidos 3, 4 y 7, reaccionaron más lentamente, logrando menores % de inhibición a iguales concentraciones que en los casos anteriores, y alcanzando un % de inhibición del 80% sólo el péptido 4, mientras que los otros dos llegaron a un máximo del 60 %.

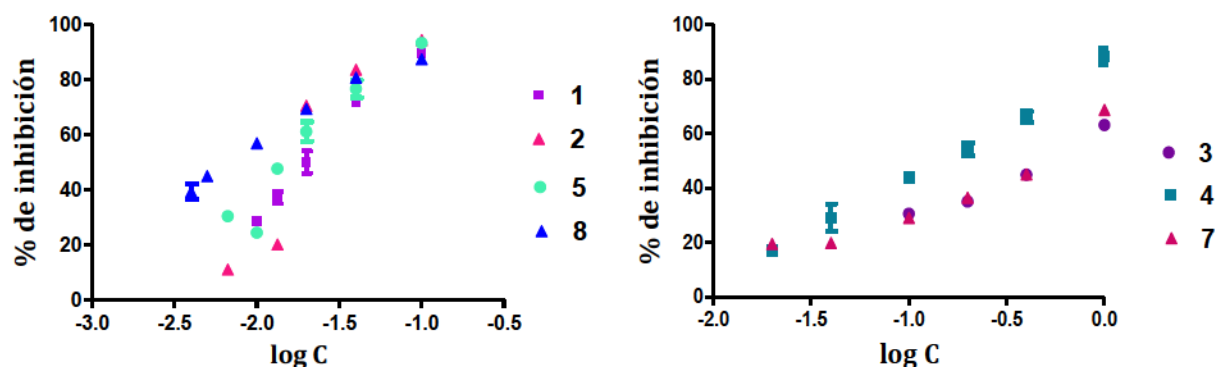


Figura IV. 5.- Resultados del ensayo ORAC para cada uno de los péptidos, agrupados de acuerdo a su comportamiento.

A partir del ajuste de dichas curvas se obtuvieron los valores de IC_{50} (Tabla IV. 5), evidenciando distintos niveles de potencial antioxidante entre los péptidos. El péptido 8, Ala-Trp-Glu-Glu-Arg-Glu-Gln-Gly-Ser-Arg (**AWEEREQGSR**) (familia 7, fracción 22) fue el que presentó el mayor potencial antioxidante, seguido de los péptidos 5 (Tyr-Leu-Ala-Gly-Lys-Pro-Gln-Gln-Glu-His (**YLAGKPQQEH**) (familia 4, fracción 22), 2 (Ile-Tyr-Ile-Glu-Gln-Gly-Asn-Gly-Ile-Thr-Gly-Met - **IYIEQGNGITGM**) (familia 2, fracción 7) y 1 (Thr-Glu-Val-Trp-Asp-Ser-Asn-Glu-Gln - **TEVWDSNEQ**) (familia 1, fracción 7), los tres con potenciales antioxidantes comparables, entre 2,3 y 3 veces menores que para el correspondiente al péptido 8. El péptido 4, seguido de los péptidos 7 y 3, si bien presentaron actividad, sus potenciales antioxidantes fueron notablemente menores (entre 6 y 90 veces) que el del péptido 8. Los valores de IC_{50} de los péptidos puros pueden ser también comparados con el valor de IC_{50} de *AisDIG* (0,024 mg/ml, *CAPITULO II*), evidenciándose niveles de actividad aproximadamente 3 veces mayores para el péptido 8, comparables o apenas mayor para los péptidos 5, 2 y 1 y mucho menores para los péptidos 4, 7 y 3.

Tabla IV. 5.- Actividad antioxidante (ORAC) de péptidos sintéticos.

	Secuencia	IC ₅₀ (mg/ml)	Intervalo de confianza del 95%
1	TEVWDSNEQ	0,020	0,017 – 0,023
2	IYIEQGNGITGM	0,017	0,015 – 0,020
3	GDRFQDQHQ	0,60	0,49 – 0,72
4	LAGKPQGEHSGEHQ	0,14	0,12 – 0,17
5	YLAGKPQGEH	0,016	0,013 – 0,018
6	LQAEQDDR	-	-
7	HVIKPPSRA	0,57	0,50 – 0,65
8	AWEEREQGSR	0,0067	0,0063 – 0,0073
9	AVNVDDPSK	-	-
10	KFNRPETT	-	-

- : sin actividad para concentraciones de hasta 1 mg/ml.

Los resultados obtenidos por el método ORAC muestran correlación con la información bibliográfica acerca de las relaciones estructura/actividad y con las características descritas por el modelo QSAR sobre péptidos antioxidantes. El péptido 8, que fue el que presentó mayor actividad, tiene un aminoácido cargado positivamente en la posición C1 y, además, aminoácidos voluminosos en las posiciones C4, N2 y C3. Según el modelo QSAR todas estas son características importantes para que un péptido presente esta propiedad, además de tener Trp cerca del extremo N terminal, lo cual también contribuiría a la actividad. El péptido 5 posee His y Tyr en sus extremos, aminoácidos que contribuyen a la actividad antioxidante según diversos autores, así como también aminoácidos voluminosos en las posiciones C4, N2 y C3 y un aminoácido cargado en la posición C1; por su parte, el péptido 2, posee Tyr y Met en los extremos, también con actividad reconocida por muchos autores, junto con aminoácidos voluminosos en las posiciones C4 y N2; por último, el péptido 1, presenta menos propiedades deseables según la bibliografía y el modelo QSAR; sólo contiene un Trp alejado de los extremos C y N-terminal y un aminoácido cargado y voluminoso en posición N2 (Glu). En el caso de los péptidos con menor actividad (4, 7 y 3),

ninguno presenta los aminoácidos más activos frente al ensayo ORAC (Tyr, Met o Trp), los mismos contienen restos de His y Pro, de menor importancia frente a esta actividad; tampoco presentan aminoácidos voluminosos en posiciones C4 o N2, ni aminoácidos hidrofóbicos en la posición C3, ni cargados en C1, N1 o N2.

Existen varias bases de datos conteniendo secuencias de péptidos bioactivos. Entre ellas, la base BIOPEP (www.uwm.edu.pl/biochemia), desarrollada por la cátedra de Bioquímica de Alimentos de la Universidad de Warmia y Mazury, Olsztyn (Polonia), contiene secuencias de péptidos bioactivos, entre otros tipos de secuencias, clasificados según su actividad. Cuenta también con un programa que posibilita la construcción de perfiles de potencial actividad biológica de fragmentos proteicos, el cálculo de descriptores cuantitativos como medidas del valor de las proteínas como precursores de péptidos bioactivos y la predicción de enlaces susceptibles de hidrólisis por endopeptidasas (Minkiewicz y col., 2008). Actualmente, esta base de datos cuenta con 474 péptidos antioxidantes con la información de su secuencia, masa molecular y la proteína de origen (salvo en unos pocos casos). Los mismos presentan tamaños entre 2 y 20 aminoácidos. No se encuentra informado hasta el momento ningún péptido proveniente de amaranto, por lo cual los resultados del presente capítulo podrán contribuir a ampliar esta u otras bases de datos que contengan péptidos antioxidantes.

En el presente capítulo se han logrado identificar péptidos antioxidantes que fueron generados por efecto de la digestión gastrointestinal simulada, especialmente de la globulina 11S de amaranto. Por lo cual podríamos pensar que estos péptidos podrían ser generados *in vivo* luego de la ingestión de proteínas de amaranto.

Pudieron detectarse distintos niveles de actividad por el ensayo ORAC, encontrándose 4 péptidos con una actividad elevada, los cuales cumplen con muchas de las características relacionadas con la actividad antioxidante concluidas en trabajos previos y en el modelado QSAR. Dichos péptidos activos pertenecen a la región ácida de la globulina 11S, y presentan las siguientes secuencias (en orden de nivel de actividad): **AWEEREQGSR > YLAGKPQQEH ~ IYIEQGNGITGM ~ TEVWDSNEQ.**

El conocimiento de las secuencias de los péptidos activos abre otras perspectivas y campos de estudio relacionados con la incorporación de estos compuestos directamente en matrices alimentarias, ya sea en forma libre o protegidos, por ejemplo por encapsulación, con la finalidad de evitar la oxidación de la matriz alimentaria o de ejercer su actividad in vivo. Resta aún evaluar la absorción intestinal de estos péptidos.

CAPITULO V

*Aplicación de preparaciones proteicas de
amaranto sobre una matriz alimentaria:*

Emulsión aceite en agua

Una emulsión consiste en dos líquidos inmiscibles (aceite y agua), uno de los cuales se encuentra disperso en forma de pequeñas gotas (fase dispersa) en el otro (fase continua) (Robins y col., 2002).

Las emulsiones se clasifican de acuerdo con la distribución de las fases oleosa y acuosa. Un sistema en el que hay gotas de aceite dispersas en una fase acuosa se denomina *emulsión aceite en agua* o *emulsión O/W* (oil in water); mientras que un sistema que consiste en gotas de agua dispersas en una fase oleosa se conoce como *emulsión agua en aceite* o *emulsión W/O*. La concentración de una emulsión se describe en términos de fracción en volumen de la fase dispersa.

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, debido a que poseen una gran área interfacial, acompañada de una alta tensión interfacial, lo que genera un aumento de la energía libre del sistema (Wagner, 2000).

Para formar una emulsión, se requiere de la presencia de aceite, agua, un agente emulsificante y el aporte de energía. Los agentes emulsificantes son sustancias que reducen la tensión adsorbiéndose y acomodándose en la interfase. Las propiedades tensioactivas de los mismos van a depender tanto de su naturaleza, como de su cantidad y de la forma en que se adsorben en la interfase. En una emulsión la región interfacial, que separa las dos fases inmiscibles, constituye sólo una pequeña fracción del volumen total. Sin embargo, tiene una gran influencia en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de la misma, incluyendo su formación, estabilidad, reología, sabor y color.

La tensión interfacial estará determinada por la magnitud del desequilibrio o desbalance de las interacciones moleculares a través de una interfase: cuanto mayor es el desequilibrio de las interacciones, mayor será la tensión interfacial (Israelachvili, 1992; Evans y Wennerström, 1994). Conceptualmente puede ser considerada como una fuerza contráctil que se manifiesta como una tendencia del sistema a minimizar el área de contacto entre las fases. El espesor y la dinámica de la región interfacial dependerá de la magnitud relativa de las interacciones entre las moléculas involucradas: cuanto más desfavorables las interacciones agua-aceite, la interfase será más delgada e inflexible (Israelachvili, 1992; Evans y Wennerström, 1994). Las moléculas de agua son capaces de

formar enlaces de hidrógeno relativamente fuertes entre sí, mientras que las moléculas de aceite son sólo capaces de interaccionar mediante fuerzas de van del Waals relativamente débiles. En la interfase agua-aceite, las moléculas de aceite forman enlaces débiles con las moléculas de agua debido a su incapacidad para formar enlaces de hidrógeno. El incremento del número de interacciones entre el aceite y el agua, al aumentar el área interfacial, es desfavorable ya que implica la sustitución de enlaces agua-agua, relativamente fuertes, por enlaces agua-aceite, relativamente débiles. Es por eso que dicha interacción agua-aceite es termodinámicamente desfavorable y, por consiguiente, en la elaboración de las emulsiones es necesario suministrar energía al sistema, con el fin de aumentar el área de contacto entre las moléculas de agua y de aceite. La cantidad de energía libre que debe ser suministrada, deberá ser proporcional al incremento en el área de contacto entre el aceite y las moléculas de agua.

Luego del proceso de homogeneización, dos líquidos inmiscibles formarán una emulsión al haber sido sometidos a una intensa agitación mecánica. Durante dicho proceso, la interfase entre las dos fases líquidas inmiscibles se deforma de tal manera que comienzan a producirse gotas, en su mayoría de tamaño grande, aumentando considerablemente el área interfacial, de manera que la energía libre superficial del sistema se incrementa (Palazolo, 2006). A través de este proceso se fabrican gotas fácilmente, siendo la deformación y la ruptura necesaria para la formación de gotas de menor tamaño un proceso más dificultoso. A fin de lograr dividir una gota durante el proceso de emulsificación, es necesario aplicar durante un cierto tiempo una fuerza externa significativamente superior a la fuerza interfacial. Dicha fuerza dependerá tanto del sistema que se esté utilizando para generar energía como de las condiciones de flujo. El tamaño de las gotas formadas finalmente dependerá del balance entre dos procesos físicos opuestos: la ruptura y la unión de las gotas.

La energía necesaria para formar y romper las gotas se suministra generalmente por agitación intensa, produciendo fluctuaciones de presión debido al flujo turbulente. Los equipos más utilizados para tal fin son los agitadores rotatorios de alta velocidad, molinos coloidales, homogeneizadores a válvula, homogeneizadores por ultrasonido o microfluidizadores (*Figura V. 1*).

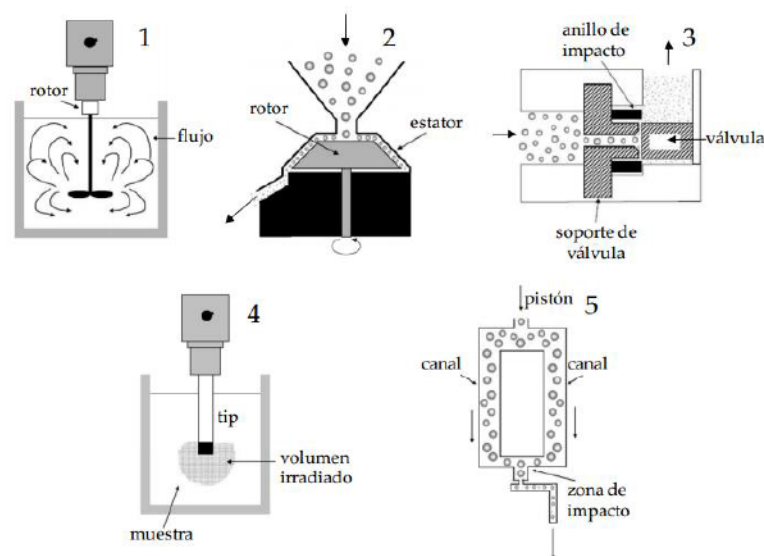


Figura V. 1.- Esquema de los distintos homogeneizadores para producir emulsiones:

- 1) Agitador de alta velocidad; 2) Molino coloidal; 3) Homogeneizador de válvulas;
4) Homogeneizador por ultrasonido; 5) Microfluidificador (Ventureira, 2010)*

Durante el proceso de preparación de las emulsiones, además de la formación de las gotas, pueden ocurrir en forma simultánea diferentes procesos de desestabilización. La preparación de las emulsiones debe ocurrir a alta velocidad para lograr estabilizar la emulsión durante un cierto período de tiempo (Israelachvili, 1992).

Agentes estabilizantes.

Las gotas de aceite deben estar estabilizadas físicamente para evitar la separación espontánea de las fases. Los agentes estabilizantes incluyen emulsificantes y aquellos que son capaces de modificar la textura. Los emulsificantes, como ya se mencionó previamente, se adsorben en la interfase aceite-agua durante el proceso de homogeneización, disminuyendo la tensión superficial aceite-agua y, por lo tanto, la energía libre total del sistema. Constan de una o más zonas que tienen afinidad por una fase polar (hidrofílicas), que normalmente es de naturaleza acuosa, y una o más zonas que tienen afinidad por la zona no polar, que es el aceite en el caso de una emulsión. Al adsorberse en la interfase, el número de contactos desfavorables entre moléculas de aceite y de agua se reduce, ya que son sustituidos por los contactos entre los segmentos no polares y polares del surfactante con el aceite y el agua, respectivamente (Israelachvili, 1992). Termodinámicamente, estas

interacciones son más favorables que las interacciones directas entre el agua y el aceite (contribución entálpica). Además, la superficie activa de los solutos, por lo general tiene segmentos polares y no polares, cuando se dispersan en agua, el contacto de los segmentos no polares con la misma es termodinámicamente desfavorable, debido al efecto hidrofóbico (contribución entrópica). De esta manera, los tensioactivos tendrán una influencia directa tanto en el tamaño de las gotas producidas por el proceso de homogeneización, así como también en la estabilidad de los mismos. Aquellos agentes que son “modificadores de la textura” estabilizan las emulsiones a través del aumento de la viscosidad de la fase continua.

Los emulsificantes pueden ser utilizados solos (emulsión modelo), mezclados (generalmente este es el caso de las emulsiones alimentarias) o asociados con polisacáridos (muchos productos alimenticios).

Clasificación de los agentes emulsificantes.

- Emulsificantes de bajo peso molecular (LMWEs).

Dentro de esta categoría se encuentran moléculas sintéticas y lípidos polares de fuentes naturales. Se trata de moléculas de una superficie activa pequeña, constituidas por una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica. La cabeza hidrofílica de los LMWEs puede ser aniónica, catiónica, zwitteriónica o no iónica, mientras que la cola hidrofóbica está generalmente constituida por una o varias cadenas carbonadas con 10 o 20 átomos de carbono.

Existen varios surfactantes utilizados en alimentos, que incluyen mono y diglicéridos (monoacil y diacil glicerol), Tweens (ésteres de polioxietilensorbitan), polisorbatos, Spans (ésteres de sorbitan), ésteres de sacarosa, entre otros. Por otra parte, dentro de la categoría de lípidos polares, las lecitinas son ampliamente utilizadas como emulsificantes en alimentos. Las mismas son generalmente mezclas complejas de lípidos polares (fosfolípidos, glicolípidos y esfingolípidos) y residuos de triacilglicerol.

- Emulsificantes de alto peso molecular (HMWEs).

Los biopolímeros anfifílicos de alto peso molecular son también ampliamente utilizados para estabilizar emulsiones O/W. En esta categoría se distinguen las proteínas y los

hidrocoloides, siendo estos últimos representados por la goma arábica, almidones modificados, celulosa modificada, algunas pectinas y galactomananos (Dickinson, 2009). La actividad interfacial de estos biopolímeros resulta de la presencia de ciertos dominios hidrofóbicos e hidrofílicos distribuidos a lo largo de sus cadenas poliméricas. Cuando estos biopolímeros anfifílicos se adsorben a la interfase aceite-agua, adoptan una conformación que permite a la parte hidrofóbica localizarse en contacto con la fase lipídica y a la porción hidrofílica con la fase acuosa. Dependiendo de las características intrínsecas de las moléculas, especialmente de la presencia de puentes intramoleculares covalentes y de la consecuente rigidez o flexibilidad de la estructura, los biopolímeros adoptarán una conformación extendida o globular en la interfase. Ciertas biomoléculas agregadas, como por ejemplo agregados proteicos, generalmente generados durante el procesamiento de los alimentos, también pueden adsorberse en la interfase y participar de la estabilización de las emulsiones (Chapleau y de Lamballerie-Anton 2003; Mahmoudi y col., 2011; Audebrand y col., 2013).

- Partículas sólidas.

Por último, ciertas partículas sólidas también son capaces de adsorberse en la interfase aceite-agua y estabilizar las emulsiones, tal como es, por ejemplo, el caso de partículas de sílice mezcladas con proteínas o surfactantes (Pichot y col., 2010).

Proteínas como emulsificantes.

Muchas proteínas son moléculas con actividad superficial que pueden ser utilizadas como emulsificantes debido a su capacidad para facilitar la formación, mejorar la estabilidad y desarrollar propiedades fisicoquímicas deseables en las emulsiones O/W. Durante el proceso de homogeneización, las proteínas se adsorben en la superficie de las gotas de aceite recién formadas, facilitando la ruptura de las mismas al producir una disminución de la tensión interfacial (Walstra, 2003). La capacidad de las proteínas de generar interacciones repulsivas (estéricas o electrostáticas) entre las gotas de aceite y de formar una membrana interfacial que sea resistente a la ruptura juega un papel importante en la estabilización de las gotas frente a los procesos de floculación o coalescencia (Wilde y col., 2004).

Luego de la adsorción en la interfase, las proteínas pueden sufrir cambios en su conformación y en las interacciones con otras proteínas debido al cambio en el entorno de la molécula. En la fase acuosa la proteína se encuentra rodeada de moléculas de agua, mientras que en la interfase O/W se encuentra rodeada por aceite y agua, además de contactarse con otras moléculas de origen proteico que se adsorben al mismo tiempo. Las proteínas, por lo tanto, sufren cambios conformacionales en su nuevo entorno para poder maximizar la cantidad de interacciones favorables y minimizar las desfavorables; el tiempo que tardan en producir dichos cambios va a estar dado por la flexibilidad y estructuración de la propia molécula (Freer, 2004).

Para muchas proteínas globulares, la desnaturalización en la interfase puede llevar a la exposición de zonas no polares y de grupos sulfhidrilos. Si las gotas de aceite estabilizadas por proteínas se aproximan demasiado, lo cual puede ocurrir por ejemplo a pHs cercanos al pI o a altas fuerzas iónicas, las mismas pueden flocular debido al aumento de la atracción hidrofóbica o por la formación de puentes disulfuro entre las proteínas adsorbidas en distintas gotas. Sin embargo, cuando las gotas se mantienen separadas unas de otras, por ejemplo, a pHs alejados del pI o a bajas fuerzas iónicas, la interacción de las proteínas en la interfase es más difícil de romper, lo que puede producir una mayor estabilidad frente a la coalescencia (Bos y van Bliet, 2001).

En resumen, las proteínas son buenos agentes emulsificantes y estabilizantes, ya que ayudan a la reducción de los tamaños de gota, pueden provocar interacciones repulsivas importantes por combinación de repulsiones electrostáticas (según pH y fuerza iónica del medio) y estéricas, forman films viscoelásticos resistentes a la ruptura sin disminuir mucho la tensión interfacial lo que le aporta rigidez al film. Además, tal como se indicó anteriormente, estas características resultan de importancia en la reducción de los procesos de floculación y coalescencia durante la formación y almacenamiento de las emulsiones (Wilde, 2004).

Propiedades físicas de las interfaces.

La capa interfacial en las emulsiones aceite en agua es la capa fina que se forma entre el aceite y el agua. Para gotas relativamente pequeñas, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 μm , la región interfacial comprende un volumen significativo del volumen total de las gotas (McClements y Decker, 2000). Las características de esta capa interfacial van a

depender en gran medida de la concentración y del tipo de moléculas adsorbidas. Mientras que los emulsificantes de bajo peso molecular generalmente forman una monocapa en la interfase aceite-agua, los biopolímeros como las caseínas, cuando se encuentran presentes en cantidades considerables, son capaces de formar multicapas (Dickinson 1999). Cuando se utilizan proteínas como emulsificantes, como se mencionó anteriormente, sólo una región de la cadena polipeptídica se encuentra en contacto directo con la interfase, mientras que el resto de la proteína se encuentra localizada en la fase acuosa. En consecuencia, sólo el 30 o 40 % de la interfase se encontrará cubierta por las proteínas, a diferencia de los que ocurre cuando se utilizan otros surfactantes, los cuales cubren cerca del 100 % de la superficie (Dickinson 1992). Las moléculas de bajo peso molecular se empaquetan mejor que las proteínas en la interfase, por lo tanto, las monocapas que se forman tienen un grosor que varía entre 0,5 y 1 nm, mientras que en aquellas emulsiones estabilizadas por proteínas el grosor del film interfacial varía entre 1 y 15 nm debido a la formación de “bucles” dentro de la fase acuosa de la porción proteica que no se unió a la interfase (Dalgleish 1993; Fang y Dalgleish 1993; Atkinson y col., 1995; Dickinson, 2009; Singh, 2011). Los LMWEs pueden competir, por lo tanto, con las proteínas por la adsorción a la interfase aceite-agua e incluso desplazar a las proteínas ya adsorbidas, lo cual puede deberse a que la velocidad de adsorción de estos surfactantes.

La temperatura de almacenamiento, la disponibilidad de oxígeno, que va a depender del envase en el que se encuentre almacenada la emulsión, la adición de iniciadores de la oxidación como sales de hierro, hemoproteínas e iniciadores radicales lipofílicos o hidrofílicos, son otros de los factores que influirán en las posibles variaciones de las interfaces.

Factores que afectan las características y la estabilidad de las emulsiones.

1.- Factores externos.

- *Tipo de homogeneizador*: Existen numerosos tipos de homogeneizadores, cada uno más adecuado para una serie de aplicaciones y un rango de sistemas determinados, en función, especialmente, de la viscosidad de ambas fases. El tipo de homogeneizador utilizado determinará principalmente el tamaño y la distribución de tamaño de las gotas en las emulsiones (McClements, 1999), mientras que la geometría de las turbinas

o agitadores utilizados afectará la eficiencia en la ruptura de las gotas de aceite durante el proceso de emulsificación (Sánchez y col., 1998).

- *Propiedades y composición de ambas fases:* La composición y las propiedades fisicoquímicas de las fases acuosa y oleosa influyen en el tamaño de gota obtenido durante la emulsificación (Phipps, 1985). El tamaño mínimo de gota que puede alcanzarse en condiciones estacionarias dependerá del tipo de aceite y de la composición de la fase acuosa y la relación de viscosidades entre las fases dispersa y continua (Braginsky y Belevitzkaya, 1996). Por otra parte, la tensión interfacial que se genere también va a depender de estos dos factores, ya que cada aceite puede contener diferentes tipos de compuestos con actividad superficial o diferente estructura molecular, y la fase acuosa puede contener una amplia variedad de componentes, tales como agentes emulsificantes, minerales, ácidos, bases, azúcares, sales, burbujas de gas, que van a influir en las características finales de la emulsión formada (Walstra, 1983).
- *Energía aplicada:* Por lo general, al aumentar la energía aplicada al sistema se produce un descenso en el tamaño de la gota formado, lo cual está asociado a un aumento de la viscosidad de la emulsión y de sus propiedades viscoelásticas, provocando una mayor estabilidad del sistema (Franco y col., 1995). Sin embargo, en algunos casos un aumento de la energía aplicada por encima de un valor crítico puede producir el efecto adverso, debido a un excesivo calentamiento o exposición del sistema a elevadas presiones, especialmente en aquellas emulsiones estabilizadas por proteínas y agentes tensioactivos de bajo peso molecular, que tienden a formar una estructura tipo gel en el medio continuo (Gallegos y col., 1996). Además, al incrementar la energía de emulsificación excesivamente se favorece en mayor grado el proceso de coalescencia que tiene lugar durante la formación de la emulsión (Franco y col., 1995).
- *Temperatura de emulsificación:* El uso de elevadas temperaturas genera tamaños de gotas menores al aumentar la solubilidad del emulsificante y provocar una reducción en la tensión interfacial, aunque también puede producir el efecto contrario, al favorecer la coalescencia de gotas ya formadas (Sánchez y col., 2001), debido a la disminución de la viscosidad de ambas fases y al aumento de la movilidad de las gotas.
- *Presencia de agentes emulsificantes:* La presencia de agentes emulsificantes en el medio favorecerá la ruptura de las gotas, conduciendo en general a la disminución del tamaño, provocando una disminución de la tensión interfacial y previniendo la

coalescencia. La adsorción de estos compuestos a la interfase requiere de su difusión en el medio continuo y de su interacción y anclaje en la misma, procesos gobernados por diferentes cinéticas (Dagorn-Scaviner y col., 1987). La efectividad de estas sustancias para reducir el tamaño de las gotas dependerá de sus características estructurales y fisicoquímicas (Walstra, 1983) lo cual va a determinar tanto la velocidad de adsorción en la interfase (Schubert y Armbruster, 1992) como la resistencia a la coalescencia.

2.- Factores intrínsecos de la emulsión.

Interacción entre las partículas de la emulsión.

- *Movimiento browniano:* Hace referencia a un movimiento traslacional y rotacional caótico, que es provocado por la misma agitación térmica, y que conduce a una distribución al azar de las partículas, lo cual puede provocar choques entre las mismas, dados los sucesivos acercamientos y alejamientos que ocurren naturalmente durante la agitación.
- *Fuerzas gravitacionales:* Mediante la acción de las fuerzas de gravedad y dada la diferencia de densidad que existe entre ambas fases, se produce un movimiento ascendente de la fase de menor densidad, lo cual genera un gradiente de concentración de esta fase a lo largo de la muestra, provocando finalmente la ruptura de la emulsión mediante el proceso de desestabilización que se conoce como *cremado o sedimentación*.
- *Fuerzas hidrodinámicas:* Para que dos gotas que son vecinas logren acercarse y unirse, deben superar la resistencia del fluido que las rodea, el cual debe excluirse del hueco que hay entre ellas, logrando vencer la fricción con la superficie de las gotas.
- *Interacciones de van der Waals:* Son interacciones intermoleculares que ocurren por la atracción que se genera entre moléculas que han sido polarizadas eléctricamente o por orientación; estas interacciones son capaces de presentarse entre cuerpos macroscópicos que contienen un gran número de moléculas, como lo son las gotas de una emulsión, además de actuar entre moléculas individuales (Hiemenz, 1986).
- *Interacciones hidrofóbicas:* Son aquellas que se ponen de manifiesto cuando en la superficie de las gotas hay un cierto grado de carácter no polar, el cual puede deberse a que las mismas no estén totalmente cubiertas por emulsificantes o porque el mismo exponga zonas no polares a la fase acuosa. Dado que la interacción entre sustancias no

polares y el agua es termodinámicamente desfavorable, el sistema intentará minimizar el área de contacto, provocando una posible agregación de las gotas (Israelachvili y Wennerström, 1996).

- *Fuerzas electrostáticas:* En aquellas emulsiones en las que se han agregado agentes emulsificantes iónicos o que son susceptibles a ser ionizados, muchas gotas tienen las superficies cargadas eléctricamente. Las partículas, además, pueden adquirir carga eléctrica por la adsorción en la interfase de pequeños iones o por fricción. Por lo general, en una misma emulsión, todas las gotas de la fase dispersa están estabilizadas por el mismo tipo de emulsificante y, por lo tanto, todas poseerían la misma carga eléctrica, lo cual provocaría interacciones electrostáticas repulsivas entre las gotas..
- *Interacciones estéricas:* En las emulsiones que se encuentran estabilizadas por agentes emulsificantes no cargados superficialmente, como aquellas que poseen moléculas de naturaleza polimérica adsorbidas, las interacciones estéricas serán las responsables de modificar la cinética de floculación (Dickinson y col., 1992).

Factores relacionados con la fase oleosa.

- *Grado de insaturación de los lípidos:* Así como ocurre en cualquier sistema que contiene lípidos, en las emulsiones la oxidación se verá favorecida al aumentar el número de insaturaciones de los ácidos grasos.
- *Componentes lipofílicos:* Pequeñas cantidades de componentes de naturaleza lipofílica que se encuentran naturalmente en los aceites comerciales, también son capaces de modificar la tendencia de las emulsiones a ser oxidadas. En primera instancia, los antioxidantes presentes naturalmente en los aceites y en los ingredientes utilizados para preparar las emulsiones, estarán directamente involucrados en la estabilidad oxidativa de las emulsiones. Además, se ha demostrado que la presencia de ácidos grasos libres en aceites emulsificados aumentaría la oxidación lipídica, lo cual podría estar relacionado con su localización en la interfase y el aumento de la carga negativa neta de las gotas de aceite, atrayendo los iones metálicos pro-oxidantes hacia la superficie de las gotas (Waraho y col., 2009).
- *Estado físico de los lípidos emulsificados:* Si los lípidos se encuentran en estado sólido en la fase oleosa, disminuirá levemente el transporte de oxígeno en comparación con el estado líquido.

- *Fracción volumétrica aceite-agua*: Dado que el tamaño de las gotas va a variar dependiendo de la fracción aceite-agua, la oxidación lipídica también se verá influenciada. Cuando la fracción oleosa aumenta, la fracción acuosa disminuye proporcionalmente, y por lo tanto la cantidad de pro-oxidantes solubles en agua también disminuirá; por lo tanto, también va a disminuir el número de radicales libres generados por gota. La velocidad de difusión de los reactivos y de las gotas va a estar afectada por la viscosidad del medio; al aumentar la fracción de aceite, disminuye la velocidad de difusión, lo cual limitará la propagación de las reacciones entre una gota y la otra.

Factores relacionados con la interfase.

- *Área interfacial*: Ciertos estudios han postulado que un aumento del área interfacial provocado por la disminución del tamaño promedio de las gotas, favorecería el acceso de especies pro-oxidantes a la fase lipídica. En consecuencia, los lípidos emulsificados se oxidarían más rápidamente que el aceite como tal (Lethuaut, 2002). Sin embargo, múltiples estudios se contradicen acerca del efecto del tamaño de las gotas de aceite (*Figura V. 2. a*). Por un lado, un menor tamaño implica una mayor área interfacial y, por lo tanto, favorece el contacto entre la fase lipídica dispersa y los pro-oxidantes en la fase acuosa. Y, por otro lado, una mayor área, también implica mayores cantidades de especies adsorbidas, que podrían tener cierto efecto protector (Let y col., 2007; Horn y col., 2009).

- *Carga eléctrica de la capa interfacial*: La carga eléctrica de la capa interfacial va a determinar las interacciones atractivas o repulsivas entre los iones metálicos, lo cual va a impactar en su habilidad para promover la oxidación (*Figura V. 2. b*). De acuerdo a este modelo, una interfase cargada positivamente, que repele a los metales catiónicos, retardaría la oxidación en comparación con una interfase cargada negativamente, que se creería que favorecería la oxidación lipídica (Mei, 1998; McClements y Decker, 2000). Dichas afirmaciones sostienen que proteínas que actúen como emulsificantes, a valores de pH por debajo de sus pIs protegerán a las emulsiones de la oxidación lipídica (Donnelly y col., 1998; Osborn y Akoh, 2004).

- *Grosor de la capa interfacial*: Una capa interfacial más gruesa tendría un mayor efecto frente a la oxidación que una capa fina, debido a un efecto “barrera” que aísla al interior de las gotitas de aceite conteniendo ácidos grasos insaturados, frente a las especies pro-oxidantes de la fase acuosa (Silvestre y col., 2000)(*Figura V. 2. c*). Dicho efecto barrera

también incluiría presuntos efectos en la estructura y características físicas de las interfaces en la difusión de reactivos.

- *Composición de la interfase*: La presencia en la interfase de quelantes de metales y/o secuestrantes de radicales libres, contribuye a la protección otorgada por la “barrera interfacial”, si se asume que ciertas interacciones específicas entre las especies emulsificantes y los antioxidantes, no interfieren en el efecto antioxidante de los mismos (Horn y col., 2009; Medina y col., 2012) (Figura V. 2. d).

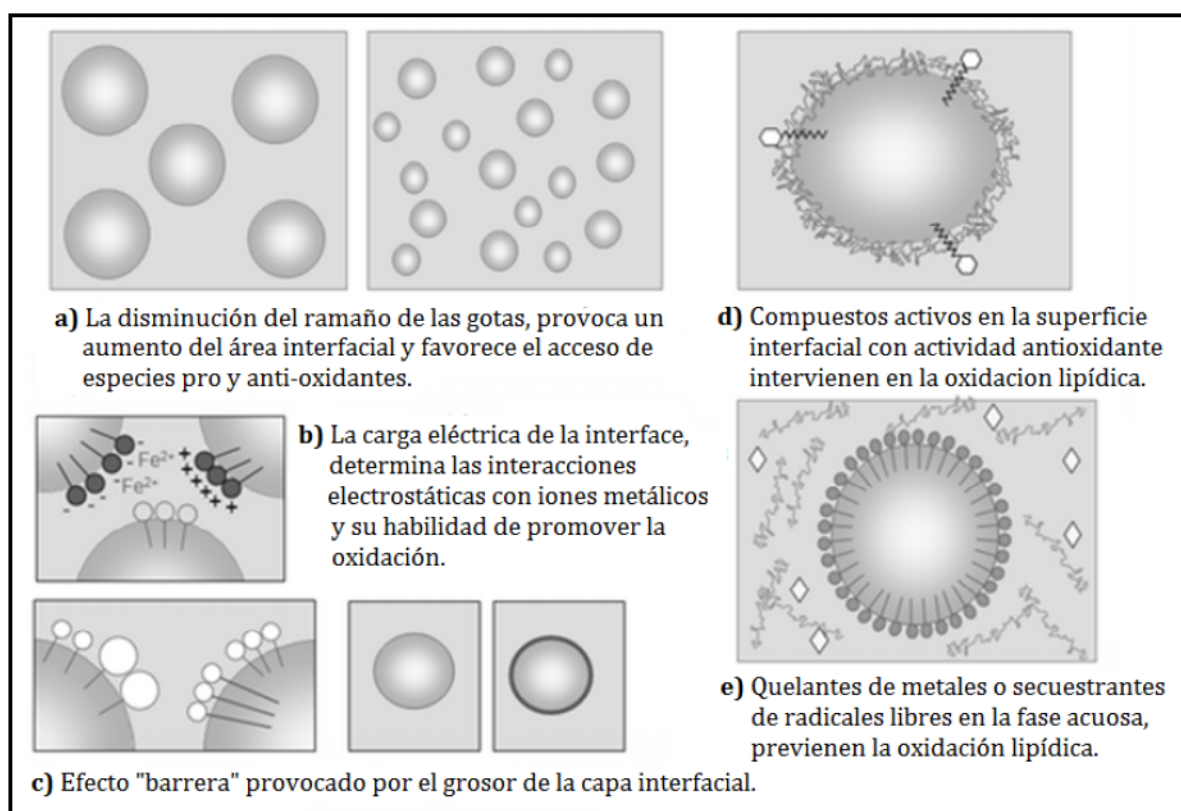


Figura V. 2.- Principales parámetros interfaciales involucrados en la oxidación lipídica de emulsiones O/W (Genot y col., 2013)

Factores relacionados con la fase acuosa.

La composición de la fase acuosa también va a influir en la estabilidad frente a la oxidación de las emulsiones, ya sea por la presencia de compuestos emulsificantes solubles en agua que no se han adsorbido a la interfase aceite-agua o debido a otras moléculas solubles en agua como sales, buffers, iniciadores de la oxidación o antioxidantes.

La fase acuosa puede estar involucrada principalmente en dos mecanismos: 1) puede favorecer o inhibir la formación o difusión de especies reactivas originalmente presentes en esta fase; 2) puede ser capaz de modificar ciertas características de la capa interfacial, previniendo o favoreciendo la migración de especies reactivas, inicialmente presentes o formadas durante el proceso de emulsificación en la fase acuosa, hacia sustratos susceptibles a la oxidación.

Las proteínas dispersas en la fase acuosa pueden inhibir las reacciones de oxidación a través de la quelación de metales o por el secuestro de radicales libres (Elias y col., 2005; Faraji y col., 2004) (*Figura V. 2. e*), mejorando la actividad antioxidante de las mismas al hidrolizarlas, dado que aumenta la exposición de residuos aminoácidos que podrían encontrarse ocluidos dentro de la proteína en su conformación nativa. Al quelar los metales, se altera la localización física de los mismos, formando complejos metálicos insolubles, reduciendo su reactividad química y/o obstaculizando estéricamente las interacciones entre los metales y los sustratos lipofílicos, como los hidroperóxidos (Díaz y col., 2003, Choe y Min, 2009). Esta habilidad de las proteínas de unir metales va a depender de su carga, que estará influenciada por el pH. A pHs por encima de su pI, estarán cargadas negativamente y serán capaces de unir iones cargados positivamente, lo cual induciría una mayor oxidación. Sin embargo, el efecto de la carga de las proteínas todavía es contradictorio, ya que algunos estudios muestran emulsiones más estables a bajos pHs (proteínas cargadas positivamente) mientras que otros muestran un efecto contrario (Berton y col., 2011).

El secuestro de radicales libres producidos en la fase acuosa y/o productos de la oxidación lipídica, también va a depender de la composición aminoácida de las proteínas, así como también de su estructura terciaria y, por ende, de los residuos de aminoácidos que se encuentren expuestos en las superficies de las gotas.

Por último, también se pueden establecer uniones no covalentes entre productos de oxidación volátiles y las regiones hidrofóbicas de las proteínas, dichas interacciones pueden resultar en una alteración de las propiedades funcionales de las proteínas, especialmente de aquellas adsorbidas en la interfase aceite-agua. Además, puede conllevar a una subestimación de la cantidad de productos de la oxidación lipídica formados, particularmente en aquellos ensayos donde se miden los productos de oxidación volátiles en el headspace, sin tener en cuenta los productos unidos a las proteínas.

No sólo las proteínas solubles en la fase continua son las que intervendrían en el proceso de oxidación de lípidos, algunos biopolímeros que fueron adsorbidos en la interfase, también podrían retardar la oxidación lipídica, lo cual generalmente se atribuye a las propiedades que poseen ciertos polipéptidos de quelar metales y radicales libres.

Mecanismos de desestabilización física de las emulsiones.

Las emulsiones son termodinámicamente inestables y se desestabilizan a través de diferentes mecanismos, los cuales, por lo general, no son independientes entre sí (Wagner, 2000). Entre ellos pueden mencionarse:

- *Separación gravitacional* (cremado/sedimentación): Por lo general, la densidad entre las gotas (fase dispersa) de una emulsión y el líquido (fase continua) es diferente, lo que va a producir una cierta fuerza de empuje sobre las mismas. Si las gotas tienen menor densidad que la fase continua tenderán a ascender, dicho proceso de desestabilización se conoce como *cremado* y ocurre en las emulsiones O/W. En cambio, si las gotas tienen una mayor densidad que la fase continua tenderán a descender, conociéndose el proceso como *sedimentación*, lo cual ocurre en las emulsiones W/O. De acuerdo con la ley de Stokes, la velocidad de cremado en una emulsión es directamente proporcional al tamaño de la gota de la fase dispersa y a la diferencia de densidad que existe entre las fases dispersa y continua e inversamente proporcional a la viscosidad de la fase continua (McClements, 1999).

Para tratar de impedir este proceso de desestabilización se puede recurrir al intento de disminuir el tamaño de las gotas, aumentar la viscosidad de la fase continua o minimizar la diferencia de densidades a través del agregado de sustancias que modifiquen la densidad de la fase acuosa.

- *Floculación*: Se denomina así al proceso por el cual dos o más gotas se unen formando un agregado o flóculo, en el cual cada una de ellas aún mantiene su identidad, es decir, permanecen sin fusionarse, provocando una disminución en el número de partículas presentes en la emulsión. De acuerdo a las fuerzas que estén actuando de manera de mantener unidas a las gotas, el proceso será reversible o irreversible. Este proceso se encuentra controlado por el equilibrio global entre las fuerzas de atracción (electrostáticas, de van der Waals, hidrofóbicas y por depleción) y de repulsión

(electrostáticas, estéricas y de hidratación). El grado de floculación alcanzado dependerá no sólo de la frecuencia de las colisiones, es decir, del número de encuentros entre gotas por unidad de tiempo y de volumen de emulsión, sino también de la eficiencia de dichas colisiones (McClements, 1999).

La floculación puede resultar favorable o perjudicial de acuerdo al tipo de sistema que se esté deseando obtener. En una emulsión diluida, la floculación conduce generalmente a un aumento del cremado, ya que los flóculos grandes se mueven más rápidamente bajo la influencia de la gravedad que las gotas dispersas individuales, lo cual no suele ser deseable ya que disminuye su vida útil (Tan y col., 2004). En una emulsión concentrada se puede producir una floculación extensiva de gotas, provocando un aumento pronunciado de la viscosidad, e incluso formando una red particular tipo gel débil, que puede eliminar el cremado por completo (Cao y col., 1990). Sin embargo, en este caso es posible que se produzca el proceso de sinéresis, que en algunos productos alimenticios es incluso más negativo que el cremado normal por gravedad (Dickinson y col., 1989). En ciertos productos, se espera una baja viscosidad y, por lo tanto, la floculación es indeseable, mientras que en otros una floculación controlada puede ser ventajosa y producir una textura deseable.

Existen diversas interacciones implicadas en el mecanismo de floculación: *interacciones electrostáticas*, en el caso de utilizar proteínas como estabilizantes, a valores de pH cercanos al pI, existen mayores posibilidades para que la floculación se produzca por la disminución de la repulsión entre las proteínas que estabilizan las superficies de las gotas (McClements, 2005), un aumento de la fuerza iónica apantallará las repulsiones electrostáticas que puedan darse por la carga de la proteína pudiendo producir floculación; *interacciones estéricas* que generalmente son repulsivas y protegen de la floculación y coalescencia; *interacciones por puenteo*, las cuales se originan cuando una molécula del biopolímero se une al mismo tiempo a dos gotas diferentes formando puentes entre ellas (Dickinson, 2003); *interacciones hidrofóbicas* que se producen entre las zonas hidrofóbicas que puedan existir en las superficies de las gotas; *interacciones por depleción* que se producen debido a la presencia de partículas coloidales en la fase continua, las cuales pueden causar interacciones atractivas entre las gotas, conllevando a la desestabilización de la emulsión; *interacciones covalentes*, que se generan cuando se intercambian puentes disulfuro entre proteínas de distintas gotas.

- *Coalescencia*: Es un proceso irreversible en el cual dos o más gotas se unen para formar una única gota de mayor tamaño, lo que deriva en una reducción del área interfacial. Es el principal mecanismo por el que una emulsión evoluciona hacia su estado termodinámico más estable, ya que implica una disminución del área de contacto entre las fases acuosa y oleosa. La ocurrencia de este proceso de desestabilización depende de la frecuencia, la energía y la eficiencia de las colisiones entre las gotas así como de la resistencia y la viscoelasticidad de la película que rodea a las mismas. Este proceso produce una desestabilización de la emulsión más rápida debido al aumento de tamaño de las partículas. En emulsiones O/W, la coalescencia conduce a la formación de una capa oleosa en la parte superior de la emulsión (“oiling off”), mientras que en emulsiones W/O conduce a la acumulación de agua en la parte inferior del sistema (McClements, 1999). Este proceso ocurre en dos etapas: primero se produce el drenado en la fase continua de la delgada película de líquido que se encuentra entre las gotas hasta que ésta alcanza un espesor crítico, y luego hay una ruptura de la capa interfacial debido a alguna fluctuación o perturbación local (Dickinson y col., 1989). Una vez que se ha formado un hueco en la interfase, el líquido del interior de la gota fluye rápidamente a través del hueco y las gotas se unen formando una sola gota de mayor tamaño. La velocidad de coalescencia dependerá de diferentes factores: el *tipo de agente emulsificante*: diferentes emulsificantes generarán diferentes tamaños de gotas, aquellos que provoquen interacciones repulsivas significativas por combinación de repulsiones electrostáticas y estéricas formarán films viscoelásticos resistentes a la ruptura sin mucha disminución de la tensión interfacial, aportando rigidez al film y a la estructura de la gota; las *condiciones de almacenamiento*: temperatura y tipo de agitación mecánica a la que se esté exponiendo a la emulsión; y la *presencia de impurezas*: ciertas impurezas podrían romper las membranas, especialmente si se somete a la emulsión a esfuerzos mecánicos (Van Aken, 2004).
- *Maduración de Ostwald*: Proceso por el cual las gotas de gran tamaño crecen a expensas de otras más pequeñas, debido al transporte de masa de la fase dispersa desde una gota a otra a través de la fase continua (Kabalnov y Shchukin, 1992; Taylor, 1995). Este proceso se encuentra favorecido cuando hay un elevado grado de polidispersión de tamaños de gotas, así como también, al contrario de lo que ocurre con otros procesos de desestabilización, por un tamaño de gotas pequeño (Kabalnov y Shchukin, 1992). Este proceso es prácticamente despreciable en emulsiones O/W que conforman la

mayoría de los productos alimenticios, pero tiene más importancia en aquellas emulsiones con aceites más solubles, como los aceites esenciales, en aquellas emulsiones que poseen una parte de alcohol en la fase continua y en emulsiones W/O. La maduración de Ostwald se produce porque la solubilidad de un material se incrementa con la disminución del tamaño de gota, lo cual hace que se solubilice más fase dispersa de las gotas más pequeñas pasando a formar parte de las gotas más grandes.

- *Inversión de fases*: Es el proceso por el que un sistema pasa de ser una emulsión O/W a una W/O o viceversa. Se puede producir por una elevada fracción volumétrica de la fase dispersa, por efecto de trabajo mecánico o de la temperatura (Campbell y col., 1996; McClements, 1999).

Mecanismos de desestabilización química de las emulsiones.

Una de las formas más comunes de desestabilización de alimentos que contienen en su composición una gran proporción de lípidos es la oxidación lipídica. Este es uno de los principales mecanismos de desestabilización química en las emulsiones y es el que analizaremos en el presente trabajo, intentando prevenir o retardar dicho efecto por el agregado de antioxidantes naturales provenientes del amaranto.

Hoy en día resulta de interés intentar evitar o retardar la oxidación de lipídica en los alimentos, ya que presenta un efecto perjudicial en la calidad tecnológica, nutricional y sensorial de los mismos (Pokorny, 2003; Frankel, 2005). Muchas veces aparecen olores desagradables (“off-flavors”), además puede ocurrir la pérdida de ciertos componentes de interés nutricional y se pueden formar radicales libres y compuestos potencialmente tóxicos (Ursini y col., 1998; Kanazawa y col., 2002; Riemersma, 2002; Liu y col., 2003; Petersen y Doorn 2004; Turner y col., 2006; Long y col., 2008).

Los alimentos formulados en muchos casos contienen una fase lipídica dispersa en un medio acuoso, es por eso que se los puede describir como emulsiones aceite en agua (O/W), las cuales se encuentran principalmente estabilizadas por moléculas activas adsorbidas en la interfase. Desde su preparación hasta su uso final, incluyendo su “disgregación” en el tracto digestivo, las emulsiones alimentarias están sujetas a un amplio rango de tratamientos fisicoquímicos. En estas condiciones y en presencia de oxígeno,

compuestos químicamente reactivos pueden ser oxidados; entre ellos, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son los más propensos a sufrir dicha oxidación.

Las estrategias llevadas a cabo por las industrias para contrarrestar la oxidación lipídica son muchas, incluyendo el uso de envasado al vacío o en atmósferas controladas, las bajas temperaturas de almacenamiento, el encapsulamiento de componentes sensibles a la oxidación y la adición de antioxidantes, entre otros. A pesar de dichos esfuerzos por parte de las industrias productoras de alimentos, aquellos productos que contienen PUFAs se encuentran sujetos a riesgos impredecibles de desarrollo de reacciones de oxidación durante su vida útil, que pueden impactar en la viabilidad económica de la cadena productiva. Dichos factores, que aún no se conocen totalmente o que no se encuentran todavía bajo control, son los que llevan a que la realización de estudios sobre la oxidación lipídica en matrices alimentarias complejas, siga siendo de gran interés.

Antecedentes de la utilización de componentes proteicos de amaranto en emulsiones.

Las propiedades emulsificantes y estabilizantes de aislados proteicos de amaranto (*A. hypocondriacus*) han sido previamente estudiadas. Los resultados obtenidos demostraron mejores propiedades de estas proteínas a pH = 2 que a pH = 8 en términos de solubilidad proteica, esparcimiento, adsorción y propiedades viscoelásticas de la interfase (Ventureira y col., 2012).

El punto isoeléctrico de las proteínas de amaranto se encuentra entre 4,5 y 6,5 (Konishi y col. 1985; Konishi y col., 1991), por lo que el signo de la carga eléctrica y la estructura molecular serán muy distintos a los dos pH en los que se realizó el estudio mencionado. A pH = 2, las proteínas se encuentran desnaturalizadas lo cual provocará un mayor desplegamiento, ocupando mayor superficie, por lo que se necesitaría menor cantidad de proteínas para poder lograr una reducción de la tensión interfacial equivalente. Además la carga positiva adquirida por las proteínas a pH ácido, evita un acercamiento de las moléculas reduciendo su posibilidad de interacción. Por otro lado, al encontrarse más desplegadas y disociadas, debido a la hidrólisis parcial que sufren por efecto del pH, tendrán mayor libertad y flexibilidad para anclarse en la interfase y así adquirir una conformación más adecuada que les permita disminuir la tensión interfacial entre la fase acuosa y el aceite (Ventureira y col., 2012).

Las globulinas de amaranto tienen grupos sulfhidrilos libres que se encuentran ocultos en el interior de la estructura (Castellani y col., 1999). A pesar de que al desnaturalizarse las proteínas a pH = 2, estos grupos pueden quedar expuestos, pudiendo formarse lentamente puentes disulfuro intra o inter moleculares, la formación de puentes disulfuro se encuentra mayormente favorecida a pHs entre 7,5 y 8,5.

A pH = 8, en cambio, las proteínas se encuentran con una estructura mucho más compacta, ya que conservan en gran medida su conformación nativa. Al estar más compactas, ocupan menos superficie por molécula, lo cual les permitirá empaquetarse sobre la superficie interfacial con más facilidad, favoreciendo el aumento de la concentración de las mismas en la interfase. La mayor asociación y estructuración de las proteínas a este pH dificultará los cambios conformacionales que deben ocurrir a nivel molecular para poder producir un descenso de la tensión interfacial (Ventureira y col., 2012).

Muchas zonas hidrofóbicas se encuentran ocultas hacia el interior de la estructura globular de las proteínas a pH = 8 evitando la interacción con el agua del medio. Aunque las proteínas sufran un cambio conformacional o desnaturalización parcial al adsorberse en la interfase, dicho cambio normalmente ocurrirá muy lentamente en una proteína globular dado que para poder producirlo es necesario atravesar una barrera energética muy grande (Dickinson y col., 1990; Mc Clements, 1993).

Si bien en trabajo previos se han utilizado proteínas de amaranto como agentes emulsificantes o estabilizantes de emulsiones, en el presente trabajo su aplicación en estos sistemas tiene por finalidad evaluar su efecto en la prevención de la oxidación lipídica. Por ello, y dado que se requiere garantizar la estabilidad de las emulsiones que serán sometidas a condiciones desestabilizantes, las proteínas se utilizarán en conjunto con un agente estabilizante reconocido. Por otra parte, se analizará el efecto de la hidrólisis de las proteínas de amaranto con alcalasa sobre su capacidad antioxidante. Se evaluará también el efecto de dos condiciones de pH (2 y 8) sobre la evolución de la oxidación lipídica y su relación con las estructuras moleculares presentes.

Estos estudios fueron realizados en forma conjunta con el Dr. Marc Anton en el laboratorio Biopolymères, Interactions, Assemblages (BIA) del Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) – Centro Nantes-Angers (Francia) en el marco de una estadía externa contemplada por CONICET.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de la adición de preparaciones proteicas de amaranto (aislado e hidrolizado con alcalasa) sobre la estabilidad oxidativa de emulsiones aceite en agua.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- » Preparar emulsiones aceite de canola en agua con la adición de aislado proteico o hidrolizado con alcalasa, a dos condiciones de pH, utilizando Tween 20 como agente emulsificante y estabilizante de las mismas.
- » Analizar la evolución de la oxidación lipídica de las emulsiones almacenadas en condiciones que aceleren dicho proceso, a través de diferentes metodologías, evaluando el efecto del agregado de las preparaciones proteicas de amaranto.
- » Analizar parámetros relacionados con la estabilidad física de las emulsiones, evaluando el efecto del agregado de las preparaciones proteicas de amaranto.
- » Evaluar el efecto de la conformación proteica/peptídica sobre los parámetros analizados.

V. 1.- Purificación del aceite.

Fundamento.

El aceite utilizado para el presente trabajo fue aceite de canola, el cual contiene una alta proporción (alrededor de un 30 %) de ácidos grasos poliinsaturados (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/bio-10t.pdf>), lo cual lo hace susceptible a la oxidación.

La purificación de un aceite permite la eliminación de lípidos polares naturalmente presentes en él, tales como fosfolípidos, mono y di-glicéridos, así como también de ciertos antioxidantes, dependiendo de la naturaleza del material adsorbente que se utilice.

En este caso, nuestro objetivo específico fue eliminar los tocoferoles presentes en el aceite, para asegurarnos que el efecto antioxidante evaluado se debiera exclusivamente a las muestras en estudio.

Procedimiento experimental.

Se adicionaron dos volúmenes de aceite de canola comercial a un volumen de alúmina (MP Alumina N Super 1, Ecochrom, MP Biomedicals) y se mezclaron primero con una espátula y luego por inversión. Dicha mezcla se dejó durante toda la noche en una cámara a 4 °C con agitación rotatoria, luego se centrifugó a 3000 x g durante 20 minutos a 20 °C, separando el aceite purificado de la alúmina. El aceite purificado fue almacenado a -20 °C hasta su utilización.

Luego de realizar la extracción de tocoferoles, se realizó la cuantificación por U-HPLC con un detector de fluorescencia, utilizando una curva de calibración externa. Se utilizó un equipo de U-HPLC DIONEX con bombas de alta presión conectado a una columna Polar Advantage II (3 x 250 mm, tamaño de partícula 3 µm, DIONEX). Para construir la curva de calibración se prepararon mezclas de α , β , γ y δ -tocoferol en hexano.

V. 2.- Preparación de las emulsiones aceite en agua.

- Soluciones buffer: Buffer fosfato 35 mM, NaCl 30,4 mM (pH = 2, μ = 0,05) y buffer Tris 35 mM, NaCl 24 mM (pH = 8, μ = 0,05).
- Muestras: Aislado de amaranto (*Ais*) y su hidrolizado con alcalasa (*Halc*) obtenidos como se describió en el *Capítulo I*. Se dispersaron (10 mg/ml) en cada uno de los buffers, agitando a temperatura ambiente durante 1 hora; luego se centrifugaron a 3000 x g durante 15 minutos a 20 °C. Se obtuvo el sobrenadante (fracción soluble), al cual se determinó la concentración proteica por el método de Lowry.

Todas las fracciones solubles (*Ais* a pH 2 y 8 y *Halc* a pH 2 y 8) fueron llevadas a la misma concentración proteica final mediante dilución en sus respectivos buffers.

- Emulsificante: Soluciones de Tween 20 en ambos buffers en una concentración de 5,83 g/l.
- Preparación de las emulsiones: Se obtuvieron emulsiones 30/70 (p/p) de aceite de canola purificado en solución de Tween 20. En primer lugar se realizó un paso de pre-homogeneización (Heidolph equipment, rotor Tyo 12F/M) durante 2 minutos a 15000 rpm. La emulsificación fue realizada en un homogeneizador a válvula (Stanted Fluid Power, Essex) a 35 bar por un período de 5 minutos/50 ml de emulsión.
- Preparación de los sistemas de estudio: Se colocaron 2,7 ml de emulsión en viales de vidrio, a los que se le adicionaron 0,3 ml de muestra y se cerraron herméticamente. De esta manera se obtuvieron 6 sistemas diferentes: controles conteniendo buffer de pH = 2 o pH = 8 (*Control pH 2* y *Control pH 8*), emulsiones con fracciones solubles de *Ais* a pH 2 y 8 (*Ais pH 2* y *Ais pH 8*), emulsiones con fracciones solubles de *Halc* a pH 2 y 8 (*Halc pH 2* y *Halc pH 8*). Se incubaron en estufa a 37 °C en agitador rotacional, tomándose muestras para su análisis a distintos tiempos hasta las 72 horas.

V. 3.- Distribución de tamaño de partículas.

Fundamento.

Propiedades de gran importancia en las emulsiones tales como la estabilidad a largo plazo, la apariencia y la textura están íntimamente ligadas a la distribución de tamaños de las partículas que contienen. Las emulsiones alimentarias son generalmente polidispersas, es

decir, el tamaño de las partículas varía dentro de un rango definido (generalmente entre un valor mínimo menor a 0,1 μm y un máximo de 20 μm o más). Por ello, se habla de distribución de tamaños de partículas, la cual se encuentra generalmente caracterizada por el diámetro promedio de las gotas y determina el número de gotas y el área interfacial total. A menor tamaño de las gotas, mayor será el número y la superficie desarrollada.

En una emulsión monodispersa este concepto carece de sentido, dado que el tamaño de las gotas esféricas puede caracterizarse de manera completa e inequívoca a través de un parámetro solo, el radio (r) o el diámetro (d). La distribución de tamaño de partículas puede representarse como una curva continua, donde la función de distribución sería representada como $F(D_i)$. La función de distribución en número $F_n(D_i)$ se genera de manera tal que el área bajo la curva en el rango de dos diámetros (D_i y $D_i + dD_i$) es igual al número de partículas en dicho rango (n_i), o sea que $n_i = F(D_i) \cdot dD_i$. A partir del mismo razonamiento pueden generarse las correspondientes funciones de distribución en superficie $F_s(D_i)$ (Ecuación V. 1) y en volumen $F_v(D_i)$, (Ecuación V. 2), asumiendo que las emulsiones están formadas por gotas esféricas (Rawle, 2005).

$$F_v(D_i) = (1/6) \cdot \pi \cdot D_i^3 \cdot F_n(D_i) \quad [\text{Ec. V. 1}]$$

$$F_s(D_i) = \pi \cdot D_i^2 \cdot F_n(D_i) \quad [\text{Ec. V. 2}]$$

A partir de las funciones de distribución pueden calcularse los distintos diámetros promedio de gran utilidad práctica: el diámetro promedio De Sauter ($d(3,2)$) (Ecuación V. 3) y del diámetro promedio de De Brouker ($d(4,3)$) (Ecuación V. 4), cuyas fórmulas no contienen el número total de gotas:

$$d(3,2) = \sum (d_i^3 \times n_i / d_i^2 \times n_i) \quad [\text{Ec. V. 3}]$$

$$d(4,3) = \sum (d_i^4 \times n_i / d_i^3 \times n_i) \quad [\text{Ec. V. 4}]$$

donde n_i es el número de gotas de diámetro d_i . El $d(3,2)$ da una idea de la superficie creada durante la emulsificación y la distribución de los $d(3,2)$ muestra el porcentaje de la superficie total creada. El $d(4,3)$ se relaciona con el porcentaje de volumen total de aceite utilizado que representa cada uno de los rangos de tamaños de gotas en la distribución. El diámetro promedio $d(3,2)$ se puede relacionar con el área interfacial específica (AIE) a partir de la siguiente expresión:

$$\text{AIE} = 6 \times \phi_m / d[3,2] \quad [\text{Ec. V. 5}]$$

donde ϕ_m es la relación volumétrica de aceite en la emulsión.

La técnica de difracción láser opera mediante la predicción del comportamiento de las partículas respecto a la dispersión de luz. Las partículas dispersan luz en todas las direcciones con un patrón de intensidad que es dependiente de su tamaño. La luz dispersada tendrá diferentes intensidades según el ángulo de observación. Se ha comprobado que las partículas pequeñas dispersan luz a grandes ángulos, mientras que las partículas grandes dispersan luz a pequeños ángulos. Si un conjunto o grupo de partículas suspendidas en aire o en cualquier otro medio transparente, como el agua o un solvente, es atravesado por un haz láser, cada partícula dispersará luz frontalmente a un ángulo inversamente proporcional a su tamaño. El principio básico considerado en los analizadores de tamaño de partículas por difracción láser es que, con ciertos límites, el patrón de dispersión creado por ese conjunto de partículas es idéntico a la suma de los patrones de dispersión individuales de todas las partículas presentes. Así, con el conocimiento de la disposición geométrica de los detectores de un instrumento y de la fuente de luz, junto con los datos que representan las intensidades relativas de la luz dispersada recibida sobre cada elemento detector del conjunto de todos los detectores, es posible calcular la distribución de tamaño de partículas. Esta simple interdependencia de la intensidad de la dispersión, de la distribución angular de la luz dispersada y del tamaño de la partícula, alcanza su límite cuando el diámetro de las partículas está próximo a la longitud de onda de la fuente de luz usada. En este punto, los efectos adicionales de interferencia producidos no pueden ser ignorados y empieza a ser más complicada la relación entre la intensidad de la dispersión y el tamaño de la partícula. Para partículas en el rango del tamaño nanométrico, donde los diámetros son menores que la longitud de onda de la fuente de luz, el uso de la difracción láser puede conducir al uso de la técnica P.C.S (Photon Correlation Spectroscopy) usando la aproximación de "Rayleigh". Para el rango donde el tamaño de partícula es mayor que la longitud de onda de la luz empleada puede ser empleada la aproximación de Fraunhofer. Cuando esta técnica es utilizada, las partículas son consideradas como discos circulares negros de dos dimensiones. En el rango donde el tamaño de las partículas es aproximadamente igual al de la longitud de onda de la fuente de luz o donde el índice de refracción de la partícula es muy similar al del medio donde está suspendida, existe una muy sensible dependencia de la intensidad de la dispersión de luz con respecto al diámetro de la partícula y del complejo índice de refracción de la partícula y el del medio que la rodea. En este caso, la rigurosa teoría

formulada por Gustav Mie (1908), no tan simple como la de Fraunhofer, proporciona la mejor solución, al comenzar a tener en cuenta los índices de refracción y de dispersión de las partículas. Actualmente, se considera que la aproximación de Fraunhofer puede ser usada para la medida de partículas superiores a 50 micras, mientras que la teoría “Mie” es recomendada para la medida de partículas inferiores a 50 micras y es aplicable a lo largo del rango completo de medida de los instrumentos de difracción láser. Equipos diseñados para la medida de tamaño por debajo de 50 micras deberían soportar uniformemente la teoría “Mie”. Actualmente, los equipos cuentan con una extensa base de datos con los índices de refracción de los materiales más comunes. La teoría “Mie” anticipa correctamente los efectos sobre el comportamiento de la dispersión de luz causado por diferencias en el índice de refracción de las partículas (McClements, 2005).

La determinación del tamaño de partículas debe hacerse en condiciones de alta dilución (relación volumétrica de aceite en la emulsión (ϕ_m) < 0,05) con agitación, para que las gotas se distribuyan de manera uniforme. Así, un pequeño volumen de la emulsión se coloca en un recipiente con agua y un haz de radiación láser incide sobre una cubeta interna transparente por donde recircula la emulsión diluida. La luz dispersada en distintos ángulos por gotas de diferente tamaño pasa por un complejo sistema óptico e incide posteriormente sobre un arreglo de detectores obteniendo un patrón de difracción de las distintas intensidades luminosas obtenidas en los distintos ángulos, y luego dichos patrones son transformados en distribuciones de tamaños de gota de acuerdo a la teoría de Mie. El software incorporado en el equipo permite traducir este patrón en la correspondiente distribución de tamaño de partículas (McClements, 1999).

Procedimiento experimental.

Se obtuvieron determinaciones de la distribución volumétrica del tamaño de las partículas durante el período de incubación de las emulsiones cada 24 horas, para lo cual se utilizó un analizador de tamaño de partícula Mastersizer Micro (Malvern) que utiliza la técnica de difracción láser. Para cada medida, en una primera instancia se estabilizó el equipo con agua destilada, hasta obtener una obscuración del 0 %; luego se agregó una gota de emulsión al agua que se encontraba recirculando y, en caso de ser necesario, se fue diluyendo con más agua destilada, hasta obtener una obscuración entre un 5 y un 10 %, procediendo a realizar la medida correspondiente una vez que se observó estabilidad en el sistema. Entre una medida y la otra, se realizaron lavados sucesivos. El programa del

equipo reportó para cada medida la distribución volumétrica de tamaños, los diámetros $d(4,3)0$ y $d(3,2)$, correspondientes al promedio aritmético de la distribución de volumen y de área de las gotas, respectivamente, así como otros parámetros estadísticos.

V. 4.- Microscopía óptica.

Las microfotografías de las emulsiones fueron obtenidas en un microscopio Carl ZEISS, Axioskop 2 (Múnich, Alemania), asociado a una cámara fotográfica digital (Carl ZEISS, Múnich, Alemania). Se utilizó un aumento de 40X con una lente Plan-Neofluar (Carl ZEISS). Se colocó una gota de la emulsión a analizar en 1 ml del buffer correspondiente (buffer fosfato pH = 2, o buffer Tris pH = 8), se tomaron 20 μ l de dicha dilución y se colocaron en un portaobjetos, cubriendo cuidadosamente con un cubreobjetos. Se evaluaron muestras tomadas cada 24 horas de incubación.

V. 5.- Determinación del consumo de oxígeno.

Para determinar el consumo de oxígeno se tomaron a cada tiempo, con una jeringa manual, 100 μ l de aire del ambiente, para cuantificar el O_2 del aire, y luego 100 μ l de muestra gaseosa del “headspace” de los viales incubados conteniendo las emulsiones, analizando ambos mediante cromatografía gaseosa. Se utilizó una columna de sílica PLOT (Molsieve 5 Å, 10 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno, Varian, Les Ulis, Francia) conectada a un cromatógrafo gaseoso HP 5890 series II (Hewlett-Packard, Böblingen, Alemania) (caudal = 30 ml/minuto, temperatura del inyector = 50 °C) en un modo isotérmico a 50 °C, acoplado a un detector de conductividad térmica (TCD) (temperatura del TCD = 125°C). Se utilizó helio como gas carrier con un flujo de 2 ml/minuto. Los picos correspondientes al oxígeno fueron luego integrados utilizando el software Borwin (JMBS Developpements, Fontaine-de-Vaucluse, Francia) y fueron normalizados por comparación con una muestra de aire del ambiente. La cantidad de oxígeno consumido en el headspace de los viales se calculó por diferencia entre el oxígeno total en el aire ambiente y el detectado a cada tiempo de incubación en el espacio cabeza de las emulsiones, utilizando la proporción teórica de oxígeno en el aire (21 %). Los resultados fueron expresados como mmoles de oxígeno consumido por kg de aceite.

V. 6.- Determinación de productos primarios de la oxidación:

Determinación de dienos conjugados

Fundamento.

La medida de los dienos conjugados, productos primarios de la oxidación lipídica, permite detectar a los hidroperóxidos con dobles enlaces conjugados provenientes del rearrreglo de las dobles ligaduras de los ácidos grasos poliinsaturados luego de su oxidación. Es un método simple, no destructivo, donde la determinación de estos compuestos se basa en que los mismos son capaces de absorber radiación ultravioleta, a una longitud de onda de 233 nm.

Procedimiento experimental.

La técnica consistió en realizar una extracción de los dienos conjugados utilizando isopropanol, que tiene la ventaja de precipitar las proteínas y solubilizar los lípidos, sin la necesidad de recurrir a una etapa de extracción lipídica engorrosa. Se mezclaron 90 µl de la emulsión con 910 µl de isopropanol. Luego se realizaron dos diluciones sucesivas en isopropanol (dilución final 9/10000), y a continuación una centrifugación a 1200 x g durante 4 minutos a 20 °C. Por último se midió la absorbancia en el sobrenadante a 233 nm; utilizando el coeficiente de extinción molar 27000 M⁻¹cm⁻¹ (Peña Ramos y Xiong, 2003). Los resultados se expresaron como mmoles de hidroperóxidos por kg de aceite (Lethuaut y col., 2002).

V. 7.- Determinación de productos secundarios de la oxidación:

Ensayo del TBA

Fundamento.

El ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) es una de las técnicas más utilizadas para medir rancidez oxidativa en alimentos y otros sistemas biológicos y consiste en determinar el incremento de productos secundarios de oxidación. Se trata de una técnica relativamente simple y que presenta en la mayoría de los casos una buena correlación con los resultados de los análisis sensoriales. Durante el ensayo se lleva a cabo la reacción entre una molécula de malonaldehído (MDA) con dos de TBA para formar un complejo coloreado el cual tiene una máxima absorción a 532 nm. La formación del complejo coloreado se encuentra

influenciada por diversos factores, tales como temperatura, tiempo de calentamiento, pH, presencia de iones metálicos y antioxidantes. Esta técnica no es sensible a bajas concentraciones de MDA; también se sabe que la reacción no es específica pudiendo involucrar a varios compuestos además del MDA, de hecho, se suele usar el término sustancias reactivas al TBA (TBARS) para incluir también a estos compuestos. Por otro lado, el MDA puede reaccionar con las proteínas obteniéndose niveles menores a los que corresponden con la oxidación existente; es por eso que el calentamiento y el medio ácido parecen ser esenciales para la liberación del malonaldehído así como para la condensación con el TBA y para el desarrollo máximo color (Hoyland y Taylor, 1991). A pesar de estas limitaciones, la técnica se considera aceptable cuando se quiere medir la variación de la oxidación en función del tiempo. El ensayo de TBA se ha llevado a cabo utilizando diversas metodologías y se ha encontrado como condiciones óptimas de reacción entre malonaldehído y TBA un calentamiento a 70 °C, durante 30 min (Botsoglou y col., 1994).

Procedimiento experimental.

En primera instancia se realizó una dilución de la emulsión en agua bidestilada (1/10) y luego se realizó una extracción ácida junto con la reacción con el TBA, mezclando 500 µl de la dilución de la emulsión con 1000 µl de una solución con 15% de ácido tricloroacético (TCA) y 0,375% de TBA 0,5 en HCl 0,25M, incubando durante 30 minutos a 70 °C (Tironi y col., 2007). El número de TBA se expresó como mmoles de malonaldehído presentes por kilogramo de emulsión a partir de la *Ecuación V. 6*.

$$\text{N}^{\circ} \text{ de TBA (mmol MDA /kg de emulsión)} = (\text{Abs} \cdot \text{Ve} \cdot 1000 \cdot \text{dilución}) / \epsilon \cdot l \cdot m \quad [\text{Ec. V. 6}]$$

donde: Abs: absorbancia a 532 nm; Ve: volumen de emulsión (ml); ϵ : coeficiente de extinción molar del complejo coloreado ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); l: camino óptico (1 cm); m: masa de aceite en la emulsión (g).

V. 8.- Determinación de proteína soluble en la fase acuosa.

Se tomaron muestras de las emulsiones cada 24 horas de incubación y se centrifugaron a 3500 x g durante 45 minutos a 20 °C, separando la fase acuosa de la parte inferior del tubo

con una jeringa. Luego, la misma se sometió a filtraciones sucesivas, primero se utilizó un filtro de 0,45 µm, luego uno de 0,20 µm y, por último, se utilizó un filtro de 0,10 µm. Finalmente se determinó la concentración de proteínas a través de la técnica de Lowry, obteniendo la concentración mediante una curva de calibración realizada con seroalbúmina bovina.

V. 9.- Análisis estadístico.

El análisis de la concentración de proteínas en la fase acuosa fue realizado mediante ANOVA. Cuando se detectaron diferencias significativas, las mismas fueron evaluadas mediante el Test de Bonferroni ($p < 0,01$) a través de la utilización del programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

Los datos obtenidos en las determinaciones de consumo de oxígeno y dienos conjugados fueron ajustados mediante regresión no lineal a través del modelo de Gompertz modificado (*Ecuación V. 7*) (Berton y col., 2011; Villière y col., 2005). Dicho modelo se utiliza para ajustar curvas que presentan una fase lag, una fase de incremento y un plateau.

$$Y = Y_0 + A \times \exp \left[- \exp \left(1 + (\mu \times \exp (1) \times (L - t)) / A \right) \right] \quad [Ec. V.7]$$

donde Y representa el consumo de oxígeno (mmoles O_2 / kg de aceite) o formación de dienos conjugados (mmoles eq HP / kg de aceite); Y_0 es igual a cero para el consumo de oxígeno o igual a la cantidad inicial de dienos conjugados en las emulsiones; t es el tiempo de incubación (h); A es el valor máximo en cada uno de los casos; μ es la velocidad de consumo oxígeno (mmoles O_2 /kg de aceite x h) o velocidad de formación de dienos conjugados (mmoles eq HP /kg de aceite x h); y L es el período lag (h).

Se aplicó una regresión no lineal para estimar los valores de L y μ con el algoritmo Marquardt, donde A fue fijado en 148 mmoles O_2 / kg de aceite para el consumo de oxígeno y 80 mmoles eq HP / kg de aceite para la formación de dienos conjugados, como se determinó experimentalmente. Las estimaciones iniciales de L y μ fueron 1 y 1 respectivamente. Los cálculos se llevaron a cabo utilizando el software Statgraphics Centurion XVI.I (StatPoint Technologies, Warranton, USA). Utilizando los valores estimados

de L y μ , se pudo calcular el valor del tiempo medio de consumo de oxígeno y de generación de dienos conjugados ($t_{1/2}$) a través de la *Ecuación V. 8* que se muestra a continuación.

$$t_{1/2} = L - [\ln (-\ln (Y - Y_0)/A) - 1] \times A / \mu \times \exp (1)$$

[Ec. V. 8]

V. 10.- Caracterización fisicoquímica de las emulsiones.

V. 10. a.- Determinación de proteína soluble.

Como se mencionó en la sección de *Materiales y Métodos*, las emulsiones se prepararon utilizando un agente emulsificante de bajo peso molecular, el Tween 20. Luego de preparadas, las mismas fueron fraccionadas en viales a los que se les adicionaron las muestras proteicas o los respectivos buffers control y se cerraron herméticamente para comenzar con su incubación en un agitador rotacional dentro de una estufa a 37 °C (*Imagen V. 3*).

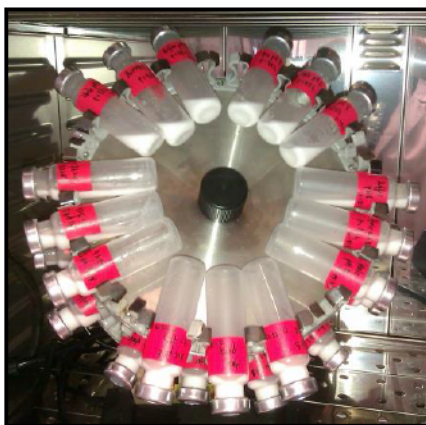


Imagen V. 3.- Incubación de emulsiones en estufa a 37 °C con agitación rotacional.

Las muestras proteicas incorporadas a las emulsiones fueron las fracciones solubles a partir de suspensiones (10 mg/ml) de *Ais* y *Halc* en cada uno de los buffers utilizados (pH = 2 y pH = 8) conteniendo la misma concentración de proteínas/péptidos. Para ello, en primer lugar se determinó la concentración de proteína soluble en cada una de dichas muestras (*Tabla V. 1*).

El *Ais* presentó mayor solubilidad proteica a pH = 2 que a pH = 8, lo cual ya había sido observado en trabajos previos en nuestro laboratorio. Este hecho puede ser atribuido a que a pH = 2, las proteínas se encuentran desplegadas, son flexibles, están parcialmente desnaturalizadas y predominan polipéptidos resultantes de la disociación y/o hidrólisis de las proteínas de amaranto, que logran solubilizarse más fácilmente que a pH = 8 donde aún mantienen su estructura globular compacta (Ventureira y col. 2010).

Tabla V. 1.- Concentración proteica de los solubles a distintos pHs.

Muestra	C (mg/ml)
Ais pH 2	5,8 ± 0,3
Halc pH 2	4,4 ± 0,2
Ais pH 8	3,2 ± 0,1
Halc pH 8	6,1 ± 0,2

Producto de la hidrólisis con alcalasa, se espera que la solubilidad aumente debido a la generación de péptidos/oligopéptidos de menor peso molecular. Esto es lo que ocurre a pH = 8; sin embargo, a pH = 2 ocurre lo contrario, la solubilidad disminuye respecto a *Ais*, lo cual puede deberse a la liberación de péptidos hidrofóbicos durante la hidrólisis, capaces de interactuar entre ellos y formar agregados insolubles, estabilizados por interacciones hidrofóbicas.

A fin de agregar a todas las emulsiones la misma cantidad de componentes proteicos/peptídicos, se realizaron las diluciones correspondientes para llevar todas las muestras a la menor concentración detectada (3,2 mg/ml). De esta manera y teniendo en cuenta la proporción de fase acuosa en los sistemas de estudio, la concentración total de proteínas agregadas a cada emulsión es del orden de 0,45 mg/ml de fase continua.

La determinación de proteínas/péptidos en la fase continua de las emulsiones inmediatamente después de su preparación presentó ciertas diferencias entre las muestras (*Tabla V. 2*). Para ambos valores de pH, las fases acuosas conteniendo *Ais* mostraron menor concentración proteica soluble que las emulsiones conteniendo *Halc*. Estos resultados sugieren que las proteínas que no fueron sometidas a una hidrólisis establecerían mayores interacciones con la interfase que los péptidos generados por la hidrólisis con alcalasa, la mayoría de los cuales permanecen solubles en la fase continua. Además, tanto para *Ais* como para *Halc*, la concentración en la fase acuosa es mayor a pH = 8 que a pH = 2, sugiriendo que a este último pH se encontrarían más favorecida la interacción de los componentes proteicos con la interfase.

El surfactante Tween 20 se empaqueta fuertemente en la interfase, cubriendo cerca del 100 % de la misma (Dickinson, 1992). Estas moléculas pueden ejercer repulsiones estéricas

debido a sus cadenas de polioxietileno (*Figura V. 4*), aunque también podrían ocurrir interacciones electrostáticas dado que en emulsiones estabilizadas por Tween 20, aun a pHs ácidos (3 y 6,7), las gotas presentan una pequeña carga negativa (Berton y col., 2011).

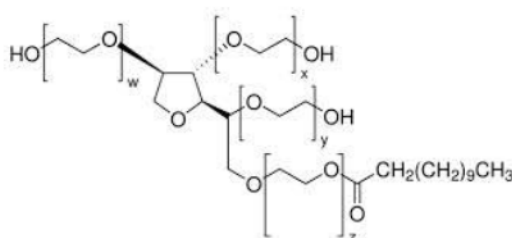


Figura V. 4.- Estructura molecular del Tween 20 ($w + x + y + z = 20$)

Tabla V. 2.- Concentración de proteínas en la fase continua de las emulsiones a distintos tiempos de incubación (mg/ml).

Muestra	Inicial	24 h	48 h	72 h
Ais pH 2	0,26 ± 0,01 ^a	0,29 ± 0,01 ^a	0,40 ± 0,02 ^b	0,39 ± 0,01 ^b
Halc pH 2	0,40 ± 0,04 ^a	0,43 ± 0,02 ^a	0,38 ± 0,01 ^a	0,43 ± 0,03 ^a
Ais pH 8	0,40 ± 0,02 ^a	0,52 ± 0,01 ^b	0,51 ± 0,05 ^b	0,58 ± 0,02 ^b
Halc pH 8	0,55 ± 0,02 ^a	0,36 ± 0,02 ^b	0,47 ± 0,01 ^c	0,40 ± 0,01 ^b

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Test de Bonferroni, $p < 0,01$)

En función de ello, proteínas o péptidos con carga positiva (pH ácido) podrían interaccionar a través de atracciones electrostáticas con las interfaces cubiertas con moléculas de Tween 20, mientras que en aquellos casos en que las proteínas tienen carga negativa (pHs por encima de su pI), podrían ocurrir ciertos efectos de repulsión electrostáticos. Lo cual podría justificar la mayor concentración de proteínas y péptidos en la fase acuosa a pH = 8, provocada por un posible efecto de repulsión entre las proteínas cargadas negativamente y el Tween 20; mientras que un efecto atractivo entre las proteínas cargadas positivamente y el Tween 20 sería una posible explicación de la menor concentración proteica en la fase continua detectada a pH = 2, además de las diferentes características estructurales que las proteínas de amaranto presentarían a cada pH, ya mencionadas anteriormente.

Las emulsiones con *Ais pH 2* no mostraron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre la concentración proteica en fase continua inicial y a las 24 horas (*Tabla V. 2*). Sin embargo, luego de 48 horas dicha concentración aumentó, manteniéndose constante a las 72 horas, lo cual indicaría que ciertas proteínas que se encontraban interaccionando con la superficie de las gotas de aceite, habrían pasado a la fase continua.

Por otra parte, en los sistemas *Ais pH 8* se observó un aumento significativo ($p < 0,01$) de la concentración proteica en la fase continua luego de 24 horas de incubación, por lo que podría estar ocurriendo el mismo fenómeno que en el caso del *Ais pH 2* pero a menor tiempo de incubación

En el caso de *Halc pH 2* no se observaron diferencias significativas durante las 72 horas de incubación ($p < 0,01$) (*Tabla V. 2*). Por último, los sistemas *Halc pH 8* presentaron un comportamiento irregular. A las 24 horas de incubación, la concentración peptídica en la fase continua disminuyó significativamente, lo cual sugeriría que ciertos péptidos/ oligopéptidos, que inicialmente se encontraban en solución, podrían incrementar su interacción con las moléculas de Tween 20 o desplazar a las mismas de la interfase. Luego de 48 horas de incubación, la concentración de péptidos en la fase continua vuelve a aumentar y a las 72 horas disminuye moderadamente, sugiriendo nuevamente intercambio de moléculas peptídicas entre la interfase y la fase continua.

V. 10. b.- Análisis del tamaño de partícula.

Para analizar la evolución del tamaño de partículas durante la incubación de las emulsiones, se realizó un análisis conjunto de los resultados obtenidos tanto por difracción de luz como por microscopía óptica.

En primera instancia se realizó una comparación de los sistemas control recién preparados a ambos pHs, observando que no presentaron diferencias entre ellos en cuanto a la distribución de tamaño de partículas (*Figura V. 5*).

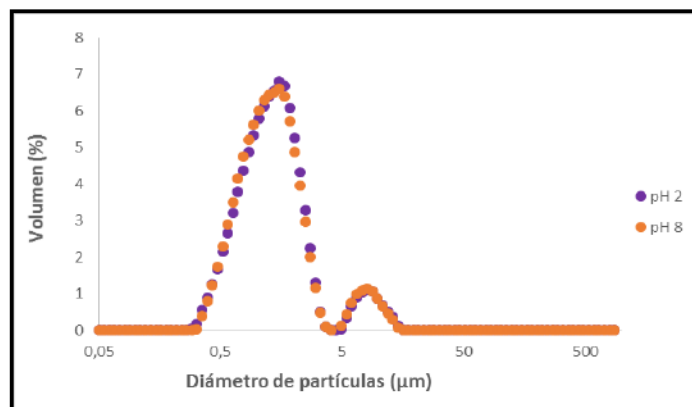


Figura V. 5.- Distribución volumétrica de tamaño de partículas de los sistemas control a $t = 0$.

En ambos casos se observa una distribución bimodal, con una alta proporción de partículas con tamaños entre 0 y 3 μm y otro grupo minoritario entre 5 y 15 μm . El valor del $d(4,3)$ fue 1,8 μm para ambos sistemas (*Tablas V. 3 y V. 4*). Resultados equivalentes fueron observados en otro trabajo en el que, utilizando Tween 20 como agente emulsificante, a pHs 3 y 6,7 no se detectaron diferencias significativas en el valor del $d(4,3)$ (1,6 y 1,4 μm respectivamente) (Berton y col., 2011)

La *Figura V. 6* muestra, a modo de ejemplo, una micrografía obtenida para el sistema control a pH = 8, en la cual se observa la predominancia de partículas de menor tamaño.

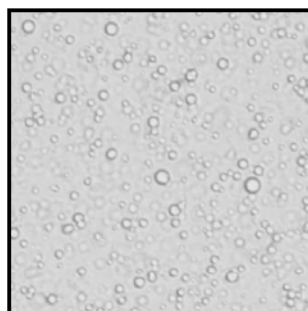


Figura V. 6.- Microfotografía del sistema control a pH 8 a $t = 0$.

Comparando la distribución volumétrica de tamaño de partículas a tiempo cero para los sistemas a pH 2, se observan perfiles similares en el caso de *Control* y *Halc* (*Figura V. 7*). Sin embargo, el sistema *Ais* pH 2 presentó una distribución de tamaños diferente, con dos poblaciones de partículas, de las cuales la más significativa presenta diámetros mayores que el *Control* (entre 3 y 40 μm), en concordancia con un aumento importante en su $d(4,3)$ (*Tabla V. 3*). A través de la microfotografía de dicho sistema puede observarse la formación de flóculos (*Figura V. 8*), lo cual justificaría la aparición de partículas de mayor tamaño

detectada. Dichos flóculos podrían producirse como resultado de la interacción entre proteínas/oligopéptidos y de las mismas con el Tween 20 que rodea las superficies de las gotas quizás mediante interacciones electrostáticas, justificando además la menor concentración de proteínas solubles detectada en este sistema (*Tabla V. 2*).

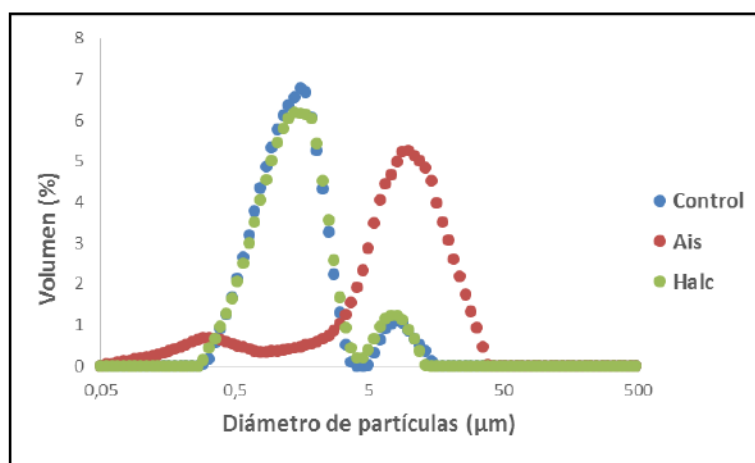


Figura V. 7.- Distribución volumétrica de tamaño de partículas de los sistemas a pH 2, t = 0.

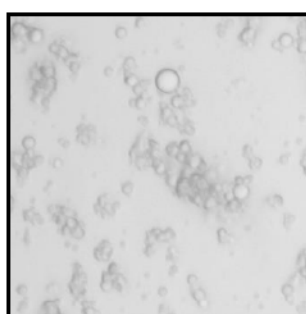
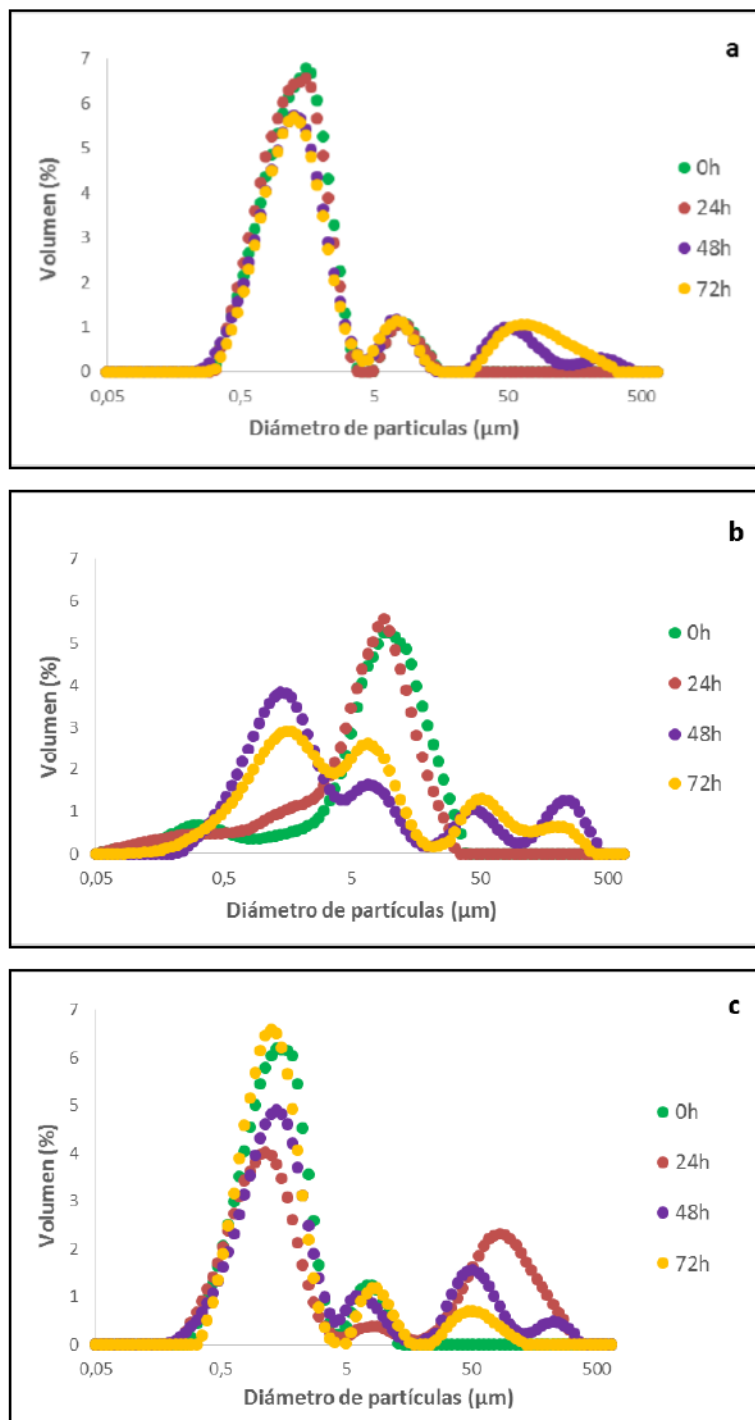


Figura V. 8.- Microfotografía del sistema Ais pH 2 a t = 0.

Tabla V. 3.- Variación del d(4,3) (μm) durante la incubación de las emulsiones a pH 2.

Muestra	0 h	24 h	48 h	72 h
Control pH 2	1,8	1,8	13,1	16,1
Ais pH 2	9,3	7,4	14,3	22,1
Halc pH 2	1,9	9,3	18,2	18,8



*Figura V. 9.- Distribución volumétrica de tamaño de partículas en el tiempo:
a) Control pH 2; b) Ais pH 2 y c) Halc pH 2.*

La distribución de tamaño de partículas de las emulsiones *Control pH 2*, no muestra diferencias entre el tiempo cero y las 24 horas de incubación (*Figura V. 9. a*). Sin embargo, a partir de las 48 horas se observa la aparición de partículas con diámetros mayores a los 25 μm y una ligera disminución de la proporción de partículas de menores tamaños ($< 3 \mu\text{m}$). El valor del $d(4,3)$ aumenta considerablemente entre las 24 y las 48 horas, con un

consiguiente aumento a las 72 horas (*Tabla V. 3*). Estos resultados podrían ser atribuibles a fenómenos de floculación-coalescencia, ocasionados por efecto del movimiento rotacional al que se encuentran sometidas las emulsiones así como a la temperatura de almacenamiento relativamente alta.

En cuanto a las distribuciones de tamaño de partículas de las emulsiones *Ais pH 2*, se pueden observar importantes cambios recién a partir de las 48 horas (*Figura V. 9. b*), lo cual también puede observarse al analizar el $d(4,3)$ (*Tabla V. 3*). Por una parte, aparece una población de partículas de pequeño tamaño ($< 3 \mu\text{m}$) que podría provenir de la separación parcial de los flóculos presentes a tiempos menores; y que podría relacionarse con el pasaje de las proteínas hacia la fase continua, tal como fue evidenciado con el aumento de la concentración proteica en la misma (*Tabla V. 2*). Además, puede observarse la aparición de nuevas partículas con diámetros mayores a $25 \mu\text{m}$ tal como se mencionó en el caso del sistema *Control pH 2*, probablemente debido al fenómeno de floculación-coalescencia. En este caso también pudo observarse este fenómeno por microscopía a las 72 horas, donde también se evidencia la presencia de flóculos (*Figura V. 10*).

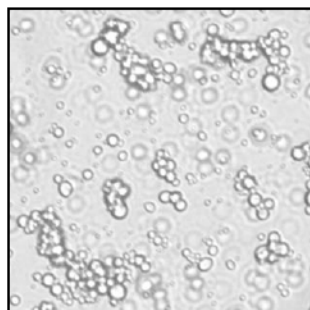


Figura V. 10.- Microfotografía del Ais pH 2 a las 72 horas.

Por otro lado, si analizamos las emulsiones *Halc pH 2* se pueden observar cambios a partir de las 24 horas de incubación, disminuyendo la proporción de partículas de las poblaciones iniciales y apareciendo un nuevo grupo de partículas con diámetros mayores a los $25 \mu\text{m}$ (*Figura V. 9. c*), lo cual también se ve reflejado en el aumento del $d(4,3)$ registrado (*Tabla V. 3*). Posteriormente, a las 48 y 72 horas de incubación se observa una reversión gradual y parcial de estos cambios en la distribución de tamaños de partículas (*Figura V. 9. c*) acompañada de un pequeño descenso en el parámetro $d(4,3)$ (*Tabla V. 3*), sugiriendo que los cambios registrados a las 24 horas podrían deberse a la formación de flóculos que luego

se disociaron parcialmente. En este caso, no se observaron diferencias en la concentración de proteínas en la fase acuosa en el tiempo.

Al analizar las emulsiones a pH = 8, se pudo ver que a $t = 0$ no se observaron diferencias entre los sistemas preparados con *Ais* o *Halc* y el *Control*, a través de ninguno de los ensayos realizados. Lo cual indicaría que a este pH, las proteínas/péptidos de amaranto no establecerían interacciones entre ellas o con la superficie de las gotas, lo cual también coincidiría con la hipótesis de posibles repulsiones electrostáticas entre las moléculas de Tween 20 y las proteínas/péptidos en estas condiciones de pH, como se mencionó previamente.

Si se analiza la evolución de la distribución de tamaño de partículas del sistema *Control pH 8* (Figura V. 11. a.) puede observarse, a partir de las 24 horas, una disminución en la proporción de partículas de tamaños menores a 3 μm , un aumento de la proporción de partículas con tamaños entre 3 y 10 μm y la aparición de pequeños grupos de partículas más grandes (mayores a 120 μm a las 24 horas y mayores a 300 μm a las 48 horas), lo cual también se evidencia al analizar el parámetro $d(4,3)$ (Tabla V. 4) que aumenta hasta las 48 horas. Lo observado anteriormente podría deberse a la formación de flóculos, algunos de los cuales lograrían separarse a las 72 horas, lo que se evidencia por la aparición de un grupo de partículas con diámetros entre 30 y 70 μm y la desaparición de ciertos grupos de partículas más grandes que se habían generado a las 48 horas, junto con una leve disminución del $d(4,3)$ entre las 48 y las 72 horas.

Tabla V. 4.- Variación del $d(4,3)$ (μm) durante la incubación de las emulsiones a pH 8.

Muestra	0 h	24 h	48 h	72 h
Control pH 8	1,8	7,3	18,6	17,8
Ais pH 8	1,8	9,4	15,5	9,6
Halc pH 8	1,8	20,8	18,6	17,1

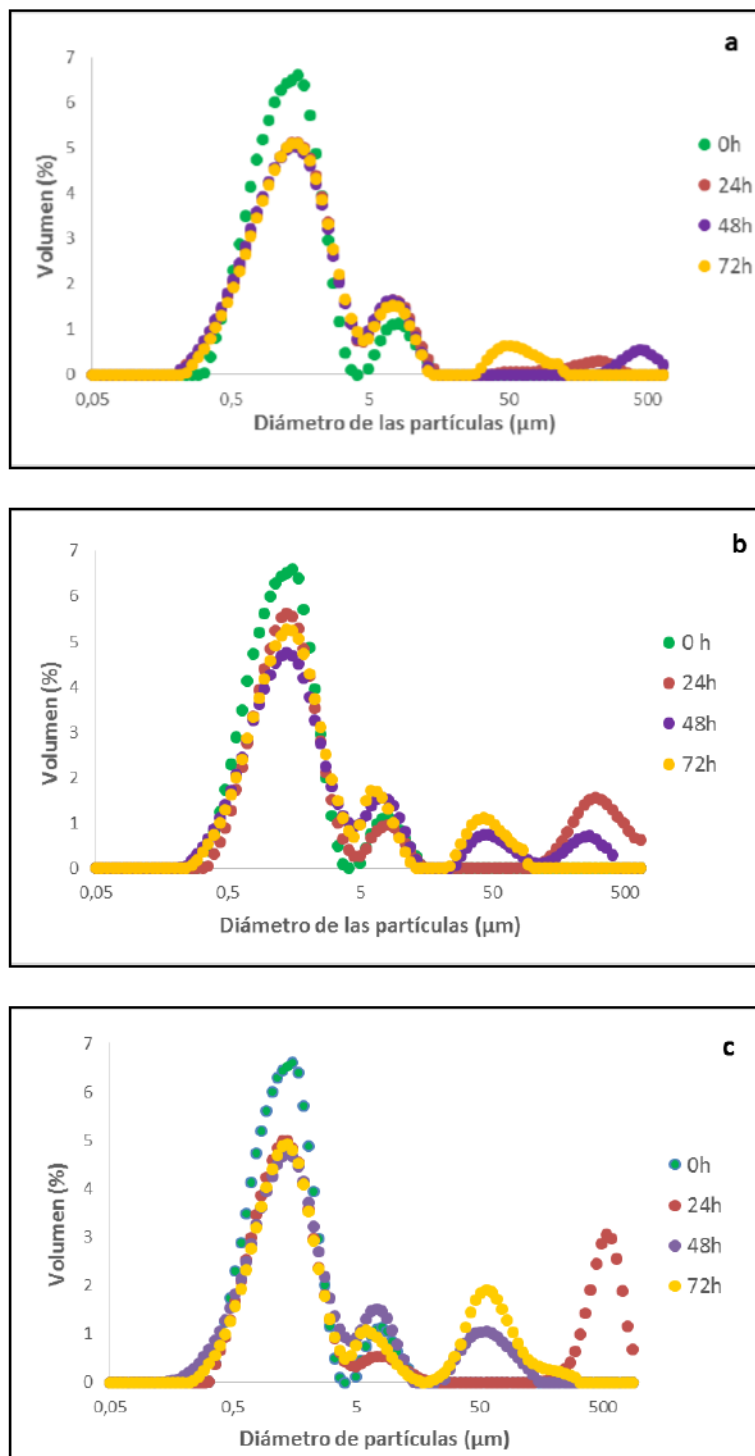


Figura V. 11.- Distribución volumétrica de tamaño de partículas en el tiempo:

a) Control pH 8, b) Ais pH 8 y c) Halc pH 8.

Las emulsiones conteniendo *Ais* (Figura V. 11. b) y *Halc* (Figura V. 11. c) a pH 8 presentaron comportamientos similares al descrito para el correspondiente *Control* en función del tiempo de incubación a 37 °C, aunque con un tamaño levemente mayor de las partículas formadas en el caso de *Halc* (Tabla V. 4). Estos resultados sugieren fenómenos de

floculación. A las 24 horas se observa la aparición de un grupo de aptículas con un diámetro mayor a 140 μm en ambos casos, el cual disminuye a las 48 horas en el caso de *Ais* y desaparece totalmente en el caso de *Halc*. Esta disminución/desaparición ocurre paralelamente con la aparición de un nuevo grupo de partículas con diámetros entre 20 y 100 μm , las cuales podrían surgir como producto de la disociación de algunos de los flóculos formados a las 24 horas. También se incrementa el volumen porcentual de partículas entre 4 y 13 μm . Por último, a las 72 horas, el grupo de partículas mayores a 140 μm desaparece totalmente en *Ais* incrementándose, en ambas muestras, aun más los grupos de partículas más pequeños, lo cual puede justificar la disminución del $d(4,3)$ para este tiempo.

V. 11.- Evaluación de la oxidación lipídica.

V. 11. a.- Consumo de oxígeno.

En todas las emulsiones se midió el consumo de oxígeno a distintos tiempos de incubación hasta las 72 horas. Un mayor consumo de oxígeno es indicativo de una mayor ocurrencia de procesos oxidativos en las emulsiones. En la *Figura V. 12. a* se muestra la cinética de consumo de oxígeno para las emulsiones preparadas a $\text{pH} = 2$. Este tipo de cinética presenta una fase lag en la que el consumo de oxígeno es mínimo y luego un aumento del mismo hasta alcanzar un valor máximo. Si bien todas las muestras llegaron a un valor máximo similar de oxígeno consumido, la velocidad de consumo fue diferente para las distintas muestras.

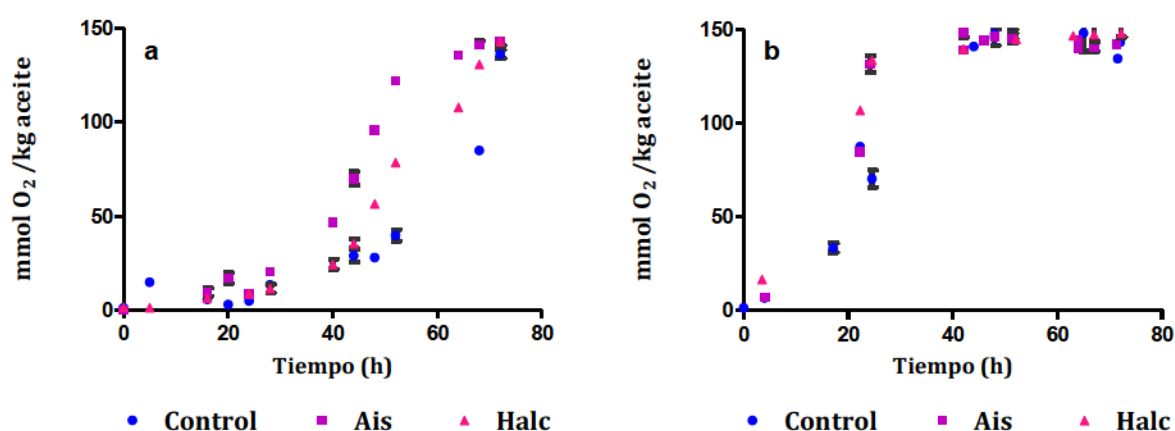


Figura V. 12.- Consumo de oxígeno en función del tiempo en emulsiones a pH 2 (a) y pH 8 (b)

Como se mencionó previamente en la sección de *Materiales y Métodos* del presente Capítulo, las curvas se ajustaron de acuerdo al modelo de Gompertz modificado, obteniéndose los siguientes parámetros: L = fase lag (horas); μ = velocidad de consumo de oxígeno (mmoles de O_2 /kg de aceite x hora); $t_{1/2}$ = tiempo empleado en consumir la mitad del oxígeno máximo consumido (horas); R^2 = porcentaje de dispersión que explica el ajuste. Los mismos se muestran en la *Tabla V. 5*.

Si analizamos lo que ocurre a pH = 2, podemos ver que la fase lag es mayor para el sistema *Control* que para *Ais* y *Halc*, con valores comparables para estos dos sistemas, lo cual puede ser apreciado tanto en los valores de L (*Tabla V. 5*) como en el gráfico de las cinéticas de consumo de oxígeno (*Figura V. 12. a*). Sin embargo, la velocidad de reacción (μ) fue similar para los sistemas *Control* y *Halc*, siendo mayor en el caso de *Ais*. Por lo tanto, a pH = 2, la presencia de *Ais* estaría favoreciendo la oxidación de la emulsión produciendo tanto una disminución del tiempo de inducción así como también un aumento de la velocidad de este proceso, lo cual se refleja también en un menor $t_{1/2}$ respecto al sistema *Control* (*Tabla V. 5*). Por otra parte, la presencia de *Halc* produjo una disminución similar en el tiempo de inducción pero no modificó la velocidad de oxidación, con un valor de $t_{1/2}$ intermedio entre el sistema *Control* y *Ais*.

Tabla V. 5.- Parámetros obtenidos de la cinética de consumo de oxígeno (modelo de Gompertz modificado).

Muestra	L (h)	μ (mmoles O_2 /kg aceite.h)	$t_{1/2}$ (h)	R^2 (%)
Control pH 2	43,2 \pm 1,2	4,1 \pm 0,2	67,1	96,3
Ais pH 2	33,1 \pm 1,9	5,8 \pm 0,9	43,9	94,8
Halc pH 2	31,4 \pm 2,1	3,9 \pm 0,4	51,5	94,6
Control pH 8	14,3 \pm 0,8	6,3 \pm 0,5	24,8	99,1
Ais pH 8	11,1 \pm 0,7	13,2 \pm 1,7	15,5	98,9
Halc pH 8	17,7 \pm 0,2	24,3 \pm 1,1	20,5	98,9

Los resultados se expresan como el estimado \pm error estándar asintótico.

Por otro lado, si se analiza lo que ocurre a pH = 8 (*Figura V. 12. b*), se observan diferencias respecto al comportamiento a pH = 2. Comparando los sistemas *Control*, puede observarse que a pH = 8 la fase lag es mucho más corta y la velocidad de consumo de oxígeno es mayor (*Tabla V. 5*), indicando que el proceso de oxidación lipídica se ve acelerado a este pH. Estos resultados concuerdan con estudios previos de emulsiones formuladas con Tween 20, en los que se observó una duplicación de la fase lag a pH ácido (pH = 3) respecto a un pH más alcalino (pH = 6,7) (Berton y col., 2011). Al utilizar β -lactoglobulina como agente emulsificante, estos autores también observaron una mayor fase lag y una menor velocidad de consumo de oxígeno a un pH superior a su pI (Berton y col., 2011).

Las emulsiones *Ais pH 8* presentaron una moderada disminución (22 %) del tiempo de inducción respecto al *Control* y un aumento de la velocidad de consumo de oxígeno, disminuyendo el valor del $t_{1/2}$ (*Tabla V. 5*). En el caso de las emulsiones *Halc pH 8* se observó un moderado aumento del valor L (24 %) respecto al *Control*, un mayor valor de velocidad de consumo de oxígeno y un $t_{1/2}$ intermedio respecto a los otros dos sistemas.

V. 11. b.- Determinación de productos primarios de la oxidación:

Determinación de dienos conjugados

A través de este ensayo se evaluaron los productos primarios de la oxidación lipídica, los hidroperóxidos (HP). La evolución de estos productos en el tiempo presentó características similares a las cinéticas de consumo de oxígeno y pudo ser ajustada también por el modelo de Gompertz modificado. A pH = 2 se observó una disminución del 17 y 20 % en la fase lag para los sistemas en los que se adicionó *Ais* y *Halc* respectivamente, (*Tabla V. 6*, parámetro *L*). Si bien los tres sistemas alcanzaron un valor máximo similar, el *Control* lo hace a una velocidad menor que el *Ais*, aunque similar a *Halc* (*Figura V. 13. a*) presentando un comportamiento similar al del consumo de oxígeno. Para el caso del *Ais*, la velocidad es mayor al doble que en los otros dos casos. Los $t_{1/2}$ de producción de HP para *Ais* y *Halc* fueron entre un 33 y un 26 % menores respecto al *Control*.

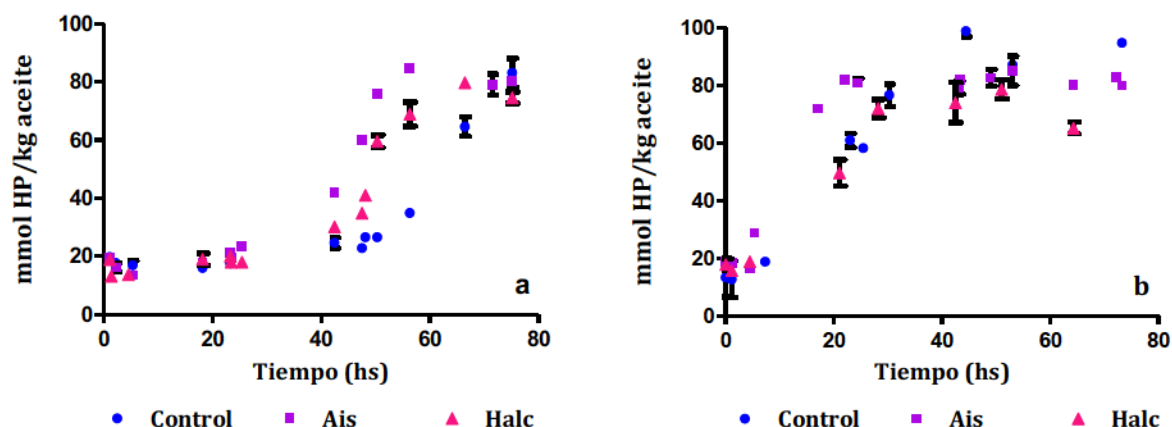


Figura V. 13.- Formación de dienos conjugados a pH 2 (a) y pH 8 (b)

Por otro lado, como se puede observar en la *Figura V. 13. b*, el comportamiento a pH = 8 es muy distinto al descripto a pH = 2, al igual que lo ocurrido con el consumo de O₂. El *Control* presentó una fase lag de alrededor de 15 horas y luego comenzaron a producirse HP al doble de velocidad que a pH = 2, alcanzando un valor máximo, luego de 40 horas, levemente mayor al de las otras muestras. En el caso de la emulsión en la que se adicionó *Ais*, la fase lag fue muy corta (3,3 horas), llegando a las 20 horas a un valor máximo de contenido de HP, el cual se mantuvo constante hasta el final del ensayo (*Tabla V. 6*). La velocidad de producción de HP en esta muestra fue similar a la del *Control*. En cambio, en las emulsiones con *Halc* si bien se observa una fase lag similar a la del *Control* y un posterior aumento del contenido de HP hasta aproximadamente las 25 horas, se detectó luego de las 40 horas una disminución de estos compuestos. Esto podría indicar que se estarían escindiendo los hidroperóxidos o reaccionando con otros compuestos. En este caso, la velocidad de producción de HP es casi el doble que en las otras dos emulsiones. Sin embargo el $t_{1/2}$ de producción de HP es solo ligeramente inferior al del *Control*.

Tabla V. 6.- Parámetros obtenidos de la cinética de formación de dienos conjugados
(modelo de Gompertz modificado).

Muestra	L (h)	μ (mmolesHP/kg aceite.h)	$t_{1/2}$ (h)	R ² (%)
Control pH 2	46,5 ± 3,8	1,9 ± 0,3	60,6	90,6
Ais pH 2	38,5 ± 1,1	5,6 ± 0,9	40,8	98,1
Halc pH 2	37,3 ± 2,1	2,2 ± 0,3	44,9	98,1
Control pH 8	15,6 ± 1,3	4,6 ± 0,7	19,5	97,5
Ais pH 8	3,3 ± 0,6	4,5 ± 0,3	6,7	99,7
Halc pH 8	17,2 ± 1,7	8,2 ± 3,2	18,5	97,7

V. 11. c.- Determinación de productos secundarios de la oxidación:

Ensayo del TBA

Al analizar los productos secundarios de la oxidación, no fue posible realizar un ajuste de resultados obtenidos con el modelo modificado de Gompertz. A pH = 2 se observa una fase lag similar para las emulsiones *Control* y *Halc*, en las cuales estos productos comienzan a incrementarse luego de las 25 horas, mientras que en el caso de *Ais* esta fase fue de aproximadamente 20 horas (*Figura V. 14. a*). Posteriormente, se detectó un rápido aumento de la generación de productos secundarios, siendo el orden de velocidad: *Ais* > *Halc* > *Control*. El sistema *Control* alcanzó su máximo valor alrededor de las 65 horas y luego presentó un descenso del mismo.

El comportamiento detectado a pH = 8 fue nuevamente diferente que a pH = 2. Alrededor de las 5 horas comenzó a registrarse aumento en la producción de productos secundarios de la oxidación para *Ais*, mientras que lo mismo ocurrió después de las 10 horas para los otros dos sistemas (*Figura V. 14. b*). Durante la etapa de formación de los mismos, el contenido de estos productos siguió el siguiente orden: *Ais* > *Control* > *Halc*. Estos resultados estarían dando el indicio de una moderada disminución en la producción de productos secundarios de oxidación en presencia de *Halc* a pH = 8. A partir de

aproximadamente las 25 horas para *Control* y *Ais* y 50 horas para *Halc* se alcanzaron valores máximos, luego de lo cual se detectó una disminución del contenido de estos productos.

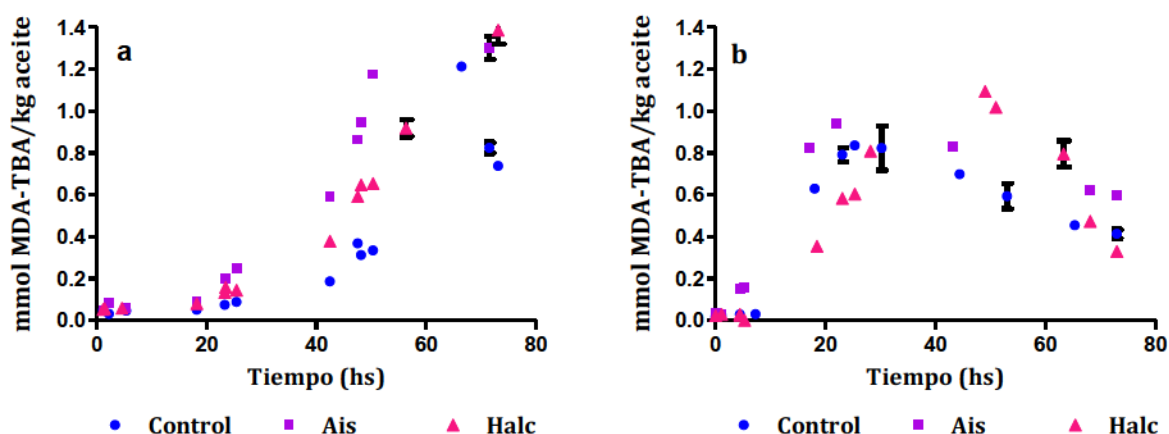


Figura V. 14.- Complejo MDA-TBA a pH 2 (a) y pH 8 (b).

Los resultados de los tres ensayos realizados para evaluar la oxidación de las emulsiones, discutidos anteriormente, muestran que:

A pH = 2:

- En todos los casos la fase lag y el $t_{1/2}$ para los ensayos de consumo de oxígeno y de producción de HP fueron mayores para el *Control* que para *Ais* y *Halc*, sugiriendo una mayor oxidación en presencia de dichas muestras.

- *Ais*: La oxidación se vio favorecida tanto al evaluar los tiempos de inducción como las velocidades de consumo de oxígeno, de producción de dienos conjugados y de productos secundarios. Dicha efecto podría justificarse debido al aporte por parte de esta muestra de ciertas especies pro-oxidantes a la interfase, como por ejemplo, metales. Como se mencionó anteriormente, estos sistemas presentaron desde el tiempo inicial la formación de flóculos con proteínas interaccionando con la interfase, lo cual podría justificar la aceleración del proceso de oxidación por un contacto mayor entre las gotas que favorecería el transporte de especies pro-oxidantes y radicales libres entre las mismas. Otra hipotética causa de esta aceleración podría ser la modificación de la monocapa interfacial por desplazamiento de moléculas de Tween 20 debida a su interacción con las proteínas.

- *Halc*: La hidrólisis con alcalasa, por otro lado, pudo haber producido la liberación de péptidos/oligopéptidos con capacidad para estabilizar oxidativamente a la emulsión en comparación con las proteínas no hidrolizadas (*Ais*). Esta muestra presentó un comportamiento similar al del *Control*, en los tres ensayos de oxidación realizados, más que nada en lo que respecta a la velocidad. Sin embargo, el *Control* fue el que presentó tiempos de inducción (L) y $t_{1/2}$ más prolongados. Por lo tanto, sólo se puede afirmar que entre las dos muestras, *Halc* estabilizaría más a la emulsión, comportándose de una manera que se aproximaría más al comportamiento del *Control*. En este caso, no se registró una interacción entre los péptidos consituyentes de *Halc* y las moléculas de Tween 20 de la interfase.

A pH = 8:

- La velocidad de oxidación a pH = 8 fue superior a la detectada a pH = 2, independientemente de la presencia de los ingredientes proteicos agregados a la emulsión.

- *Ais*: presentó los menores tiempos de inducción y $t_{1/2}$ en todos los casos, así como mayor velocidad en el consumo de oxígeno y en la generación de productos secundarios, que el *Control*. Por lo cual, en este caso también la muestra podría estar aportando ciertas sustancias que favorecerían la oxidación, como se observó a pH = 2.

- *Halc*: Se registraron moderados aumentos en los tiempos de inducción para el consumo de oxígeno y la producción de HP, lo cual indica un retardo en el inicio del proceso de oxidación. Sin embargo, las velocidades de dichos procesos aumentaron en presencia de esta muestra, con $t_{1/2}$ intermedios entre el *Control* y *Ais*. En el caso de la formación de productos secundarios de la oxidación, la velocidad de producción fue menor en presencia de *Halc*. Estos resultados sugieren que *Halc* podría ejercer un cierto efecto protector frente a la oxidación, particularmente en lo referente a la producción de compuestos secundarios. Ensayos preliminares realizados en sistemas similares pero conteniendo mayor concentración de *Halc* en la fase acuosa mostraron un retardo más evidente que en este trabajo del consumo de oxígeno, sugiriendo un efecto de la concentración de péptidos presentes sobre la inhibición de la oxidación.

Por otra parte, trabajos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio evaluando la capacidad antioxidante de *Ais* y *Halc* en otras matrices alimentarias indicaron que la

presencia de *Halc* en aceites de canola o girasol produjo un aumento del período de inducción de la oxidación lipídica y una inhibición de la descomposición de productos de oxidación primarios en secundarios (Tironi y Añón, 2014). Asimismo, la adición de *Ais* o *Halc* (2 % p/p) en productos restructurados a base de pescado produjo una inhibición parcial la formación de productos secundarios de la oxidación (García Fillería y Tironi, 2015).

En esta última etapa de la tesis, el objetivo que nos planteamos fue adicionar muestras con actividad antioxidante comprobada *in vitro* a una matriz de origen alimentaria, una emulsión, para evaluar si dichas muestras también serían capaces de retardar la oxidación lipídica del alimento.

Los ensayos realizados, fruto de una estancia corta en el laboratorio BIA-INRA de Nantes (Francia), son de carácter preliminar y requieren de un estudio más profundo en un futuro próximo. Evaluando diferentes condiciones de preparación de las emulsiones, de concentración proteica, de incubación y de seguimiento de la oxidación. A pesar de ello, constituyen un eslabón más en las evidencias de nuestro laboratorio que sugieren un rol protector de los péptidos de amaranto en la oxidación de matrices alimentarias.

Los resultados alcanzados sugieren un posible efecto protector leve de los péptidos surgidos de la hidrólisis con alcalasa de proteínas de amaranto, en la generación de productos secundarios de la oxidación a pH = 8.

Cabe señalar que los resultados discutidos en los capítulos anteriores, realizados sobre sistemas acuosos más simples, que evalúan el efecto directo de los péptidos sobre distintas especies reactivas, fueron más contundentes que los registrados en este caso. A nuestro criterio, una diferencia importante es la mayor complejidad del sistema seleccionado en el presente capítulo, dada la presencia de dos fases, la existencia de partículas provenientes de diferentes fuentes y la interacción entre los diferentes componentes de la emulsión. Consideramos que los resultados alcanzados no sólo se encuentran influenciados por la posible actividad antioxidante de las proteínas/péptidos de amaranto sino también por la dinámica del sistema, especialmente por los cambios continuos que ocurren en la interfase, sitio clave para el proceso de oxidación.

CONCLUSIONES
GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo nos propusimos en primera instancia estudiar las propiedades antioxidantes de las proteínas de amaranto sometidas a una digestión gastrointestinal simulada, evaluando el efecto que ejercerían frente a diversas especies reactivas de importancia fisiológica. Asimismo, se analizó si una hidrólisis previa de estas proteínas con alcalasa mejoraría dicha actividad.

Logramos establecer un protocolo de digestión gastrointestinal simulada que permitió obtener elevados grados de hidrólisis, liberándose péptidos cortos con tamaños coincidentes con los requeridos para ejercer una actividad antioxidante.

Se estableció que el hidrolizado obtenido por digestión gastrointestinal del aislado proteico de amaranto es el más activo de todos los evaluados y que la hidrólisis previa de las proteínas con alcalasa no contribuye a una mayor actividad antioxidante luego del proceso de digestión realizado.

Se determinó que los digeridos obtenidos poseen una importante capacidad secuestrante de radicales peroxilo (ORAC), radicales hidroxilo (EPR-HO·) y peroxinitritos, a través de reacciones en las que estarían involucrados mecanismos de donación de átomos de hidrógeno. Los péptidos liberados por la digestión también muestran actividad quelante de metales (HORAC) aunque en menor extensión que la actividad secuestrante.

Se comprobó la potencial absorción de algunos péptidos antioxidantes a través de monocapas de células Caco2-TC7 que simulan la pared intestinal con sus enzimas, receptores y mecanismos de absorción propios. Y en algunos casos, luego de la absorción la actividad antioxidante se vio incrementada.

Se lograron identificar cuatro secuencias peptídicas derivadas de la globulina 11S de amaranto, luego de la digestión gastrointestinal simulada, con un buen potencial antioxidante. Se destaca la actividad mostrada por el péptido **AWEEREQGSR**, 3 veces más potente que el digerido del cual provenía. Cabe señalar la importancia de la utilización de una aproximación *in silico* en la selección de péptidos bioactivos.

Se realizaron los primeros pasos en la evaluación de aislado y su hidrolizado con alcalasa como antioxidantes en una matriz emulsionada. Si bien en las condiciones ensayadas, el

aislado mostró efectos pro-oxidantes, el hidrolizado fue capaz de retardar levemente el inicio de la oxidación y la producción de compuestos secundarios en emulsiones preparadas a pH = 8.

REFERENCIAS
BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abdel-Aal, E. S. M. (2008) "Effects of baking on protein digestibility of organic spelt products determined by two in vitro digestion methods." LWT-Food Science and Technology, 41: 1282-1288.

Abugoch, L. E, Martínez E. N. & Añón, M. C. (2003) "Influence of the extracting solvent upon the structural properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) glutelin." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 4060-4065

Adachi, M., Kanamori, J., Masuda, T., Yagasaki, K., Kitamura, K., Mikami, B. & Utsumi, S. (2003) "Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homohexamer." Proceedings of the National Academy of Sciences, 100 (72): 7395-7400.

Adachi, M., Takenaka, Y., Gidamis, A. B., Mikami, B. & Utsumi, S. (2001) "Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer." Journal of Molecular Biology, 305: 291-305.

Addison, J. M., Burston, J. A., Dalrymple, D. M., Matthews, J. W. & Payne, M. H. (1975) "A common mechanism for transport of di and tripeptides by hamster jejunum *in vitro*." Clinical Science and Molecular Medicine, 49: 313-322.

Adler, G. (1997) "Regulation of human pancreatic secretion." Digestion, 58-139.

Adler - Nissen, J. (1979) "Determination of degree of hydrolysis of food proteins hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid." Journal Agricultural Food Chemistry, 27: 1256-1262.

Aito-Inoue, M., Lackeyram, D., Fan, M. Z. & Sato, K. (2007) "Transport of a tripeptide, Gly-Pro-Hyp, across the porcine intestinal brush-border membrane." Journal of Peptide Science, 13: 468-474.

Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santin, E., Gómez-Guillén, M. & Montero, P. (2011) "Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptides sequences isolated from squid gelatin hydrolysate." Food Chemistry, 125: 334-341.

Almeida, I., Fernández, E., Lima, J., Costa, P. & Bahía, M. (2008). "Walnut (*Juglans regia*) leaf extract are strong scavengers of pro-oxidant reactive species." Food Chemistry 106: 1014-1020.

Aluko, R. E. & Monu, E. (2003) "Functional and Bioactive Properties of Quinoa Seed Protein Hydrolysates." Food Chemistry and Toxicology, 68(4): 1254-1258.

Anderson, J. W., Hanna, T. J., Peng, X. & Kryscio, R. (2000) "Whole grain foods and heart disease risk." Journal of the American College of Nutrition, 19: 291S-299S.

Ao, J. & Li, B. (2013) "Aminoacid composition and antioxidant activities of hydrolysates and peptide fractions from porcine collagen." Food Science and Technology International, 18(5): 425-434.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists Inc. (1965) Official Methods of Analysis. Pág. 495.

Aphalo, P., Castellani, O. F., Martínez, E. N. & Añón, M. C. (2004) "Surface Physicochemical Properties of Globulin - P Amaranth Protein" Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 616-622.

Artursson, P. & Karlsson, J. (1991) "Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells." Biochemical and Biophysical research communications, 175(3): 880-885.

Aruoma, O. I. (2003) "Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods" Mutation research, 523-24, 9-20

Ashwell, M. (2001) "Functional foods: A Simple Scheme for Establishing the Scientific Basis for all Claims." Public Health Nutrition, CABI Publishing, Oxford, UK, 4 (3): 859-862.

Atkinson, P. J., Dickinson, E., Horne, D. S. & Richardson, R. M. (1995) "Neutron reflectivity of adsorbed beta-casein and beta-lactoglobulin at the air/water interface." Journal of Chemistry Society, Faraday Trans 91:2847-54.

Audebrand, M., Ropers, M.H. & Riaublanc, A. (2013) "Disappearance of intermolecular beta-sheets upon adsorption of beta-lactoglobulin aggregates at the oil-water interfaces of emulsions." Food Hydrocolloids, 33:178-185.

Aurand, L. W., Boone, N. H. & Gidding, G. G. (1977) "Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation." Journal of Dairy Science, 60:363-369.

Barba de la Rosa, A. P., Fomsgaard, I., Laureen, B., Mortensen, A., Olvera-Martínez, L., Silva-Sánchez, C., Mendoza-Herrera, A., González-Castañeda, J & De León-Rodríguez, A. (2009) "Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality." Journal of Cereal Science, 49: 117-121.

Barba de la Rosa, A.P, Gueguen, J., Paredes-López, O. & Viroben, G. (1992) "Fractionation procedures, eletrophoretic characterization and amino acid composition of amaranth seed proteins." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40: 931-936.

Bareis, P., Kallay, E., Bischof, M., Bises, G., Hofer, H., Potzi, C., Manharot, T., Bland, R. & Cross, H. (2002) "Clonal differences in expression of 25-hydroxyvitamin D(3)-1-alpha-hydroxylase of 25-hydroxyvitamin D(3)-24-hydroxylase and of the vitamin D receptor in human colon carcinoma cells: effects of epidermal growth factor and 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3)." Experimental Cell Research, 276: 320-327.

Baró, L., Jiménez, J., Martínez-Férez, A. & Bouzá, J. (2001) "Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales." Ars Pharmaceutica, 42: 135-145.

Barrio, D.A. & Añón, M.C. (2009) "Potencial antitumoral properties of proteins isolated from Amaranth sedes." European Journal of Nutrition, 49(2):73-82.

Becker, R. (1981) "A compositional study of amaranth grain." Journal of Food Science, 46 (4): 1175-1180.

Becker R. (1989) "Preparation, composition, and nutritional implications of amaranth seed oil." Cereal Foods World, 34 (11): 950-953.

Beckman, J.S. & Koppenol, W.H. (1996) "Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: The good, the bad and ugly." American Journal of Physiology, 271: 1424-1437.

Bellisle, F., Diplock, A.T., Hornstra, G., Koletzko, M. & Robertfroid, M.B. (1998) "Functional Food Science in Europe." British Journal of Nutrition, CABI Publishing, Oxford, UK, 80 (1): 1-193.

Bengoechea Ruiz, C. (2006) "Estudio reológico de emulsiones alimentarias estabilizadas con proteínas vegetales." Tesis Doctoral, Facultad de Química, Sevilla.

Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. (1996) "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay." Analytical Biochemistry, 239:70-76.

Berg, R., Haenen, G.R., Berg, H. & Bast, A. (1999) "Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures." Food Chemistry, 66: 511- 517.

Berton, C., Ropers, M. H., Vian, M. & Genot, C. (2011) "Contribution of the lipid interfacial layer to the Protection of Emulsified Lipids against Oxidation." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59: 5052-5061.

Betteridge, D.J. (2000) "What is oxidative stress?." Metabolism, 49: 3-8.

Bielski, B. H. J. & Cabelli, D. E. (1995). "Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution." Active Oxygen Chemistry, 66-104.

Bielski, B. H. J, Cabelli, D. E., Arudi, R. L. & Ross, A. B. (1985) "Reactivity of RO_2/O_2^- radicals in aqueous solution." Journal of Physical and Chemical Reference Data, 14: 1041-1100.

Boissen, S. & Eggum, B. O. (1991) "Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals." Nutrition Research Reviews, 4: 141-162.

Boldyrev & Johnson. (2002) "Carnosine and related compounds: antioxidant dipeptides." Kerala, India: Research Signpost, 101-114.

Bompadre, S., Leone, L., Politi, A. & Battino, M. (2004) "Improved FIA-ABTS method for antioxidant capacity determination in different biological samples" Free Radical Research, 38: 831-838

Bos, M.A. & van Vliet, T. (2001) "Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review." Advances in Colloid and Interface Science, 91: 437-471.

Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J. & Trakatellis, A. G. (1994) "Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42: 1931.

Braginsky, L. M. & Belevitskaya, M. A. (1996) "Kinetics of droplets breakup in agitated vessels." Liquid-Liquid Systems, Kulov, N. N. Ed., Nova Science, Commack, Nueva York.

Bratovanova, J. & Petkov, D. D. (1987) "Glycine flanked by hydrophobic bulky aminoacid residues as minimal sequence for effective subtilisin catalysis." Biochemical Journal, 248, 957-960.

Breene, W. M. (1991) "Food uses of grain amaranth." Cereal Foods World, 36: 426-430.

Bressani, R. (1994) "Composition and nutritional properties of amaranth." Amaranth, Biology, Chemistry and Tecnology, Ed. Paredes-López, O., Florida: 185-206.

Bressani, R. & García Vela, L.A. (1990) "Protein fractions in Amaranth grain and their chemical characterization." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38: 1205-1209.

Bromley, E. H. C., Krebs, M. R. H., & Donald, A. M. (2005) "Aggregation across the lengthscales in β -lactoglobulin." Faraday Discussions, 128: 13-27.

Burrell, M. M. (1993) "Enzymes of molecular biology." Totowa: Humana Press.

Cai, Y., Sun, M., Wu, H., Huang, R. & Corke, H. (1998) "Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse Amaranthus species." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 2063-2070.

Campbell, I., Norton, I. & Morley, W. (1996) "Factors controlling the phase inversion of oil-in-water emulsions." Netherlands Milk and Dairy Journal, 50: 167-182

Cao, G., Booth, S., Sadowski, J. A. & Prior, L. (1998). "Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables." The American Journal of Clinical Nutrition, 68:1081-1087.

Cao, Y., Dickinson, E. & Wedlock, D.J. (1990) "Creaming and flocculation in emulsions containing polysaccharide." Food Hydrocolloid, 4(3): 185-195.

Castellani, O.F. (2000) "Caracterización estructural y fisicoquímica de la globulina-P de amaranto." Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Castellani, O. F., Martínez, E. N. & Añón, M. C. (1999) "Role of disulfide bonds upon the structural stability of an amaranth globulin." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 3001-3008.

Castellani, O. F., Martínez, E. N. & Añón, M. C. (1998) "Structural modifications of an Amaranth globulin induced by pH and NaCl." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 4846-4853

Castillo, R., Chiriboga, C. & Fontanilla, M. (2006) "Estandarización de un modelo basado en monocapas de células Caco-2 con aplicación en estudios de absorción de fármacos." Revista Colombiana de Ciencia en Química y Farmacia, 35(2): 177-191.

Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S. & Marc, I. (2007). "Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates." Process Biochemistry, 42:1419-1428.

Chan, K. M. & Decker, E. A. (1994) "Endogenous skeletal muscle antioxidants." Critical Reviews of Food Science and Nutrition, 34: 403-426.

Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A. & Rousset, M. (1994) "Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation." Journal of Cell Science, 107: 213-225.

Chapleau, N. & de Lamballerie-Anton, M. (2003) "Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation." Food Hydrocolloids, 17: 273-280.

Charman, W. N., Porter, C. J. H., Mithani, S. & Dressman, J. B. (1997) "Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH." Journal of Pharmaceutical Science, 86: 269– 282.

Chen, H., Muramoto, K., Yamauchi, F. & Nokihara, K. (1996) "Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide derived from digests of a soybean peptides." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 2619-2623.

Chen, H., Muramoto, K., Yamauchi, F. & Nokihara, K. (1998) "Antioxidative properties of histine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 49–53.

Chen, S. & Paredes López, O. (1997) "Isolation and characterization of the 11S globulin from amaranth seeds." Journal of Food Biochemistry, 21: 53-65

Choe, E. & Min, D. B. (2009) "Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8: 345– 358.

Clarke, L.L. (2009) "A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine." American Journal of Physiology, 296(6): 1151-1166.

Clausen, M., Skibsted, L. & Stagsted, J. (2009) "Characterization of major radical scavenger species in bovine milk through size exclusion chromatography and functional assays." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 2912-2919.

Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J. & Maitland, N.J. (2005) "Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells." Cancer Research, 65: 10946-10951.

Conforti F., Statti G., Loizzo M., Sachetti G. & Poli F. (2005) "In vitro antioxidant effect and inhibition of α -amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds." Biological and Pharmaceutical Bulletin, 6: 1098–1102.

Cotelle, N., Bemier, J.L., Catteau, J.P., Pommery, J., Wallet, J.C. & Gaydou, E.M. (1996) "Antioxidant properties of hydroxyl flavones." Free Radical Biology and Medicine, 20:35-43.

Csáky, T.Z. (1984) "Methods for investigation of intestinal permeability." Pharmacology of Intestinal Permeation, 91-111.

Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M. & Shahidi F. (2008) "Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates." Food Chemistry, 109: 144-148.

Czapski, G. & Goldstein, S. (1995) "The role of the reactions of NO with superoxide and oxygen in biological systems: A kinetic approach." Free Radical Biology and Medicine, 19: 785-794.

Dagorn-Scaviner, C., Gueguen, J. & Lefebvre, J. (1987) "Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors." Journal of Food Science, 52 (2): 335-341

Dalgleish, D. G. (1993) "The sizes and conformations of the proteins in adsorbed layers of individual caseins on latices and in oil-in-water emulsions." Colloids Surfactants Biointerfaces, 1: 1-8.

Daugherty, A. L. & Mersny, R. J. (1999) "Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier." Pharmaceutical Science and Technology Today, 2: 144-151.

Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B. & López Fandiño, R. (2004) "Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis." Journal of Food Proteins, 67: 1939-1944.

Davidovich, L.A., Sulé, C.L. & Lupin, H.M. (1980) "Kinetics of fish meal oxidation." Journal of American Oil Chemistry Society, 57: 43-47.

Delie, F. & Rubas, W. (1997) "A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model." Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, 14: 221-286.

Di Virgilio, A. L., Reigosa, M., Arnal, P. M. & Fernandez Lorenzo de Mele, M. (2010) "Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells." Journal of Hazardous Materials, 177: 711-718.

Diaz, M., Dunn, C.M., McClements, D. J. & Decker, E. A. (2003) "Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 2365-2370.

Dickinson, E. (1999) "Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology." Colloids Surface and Biointerfaces, 15: 161-176.

Dickinson, E. (2009) "Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers." Food Hydrocolloids, 23: 1473-1482.

Dickinson, E. (2003) "Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems." Food hydrocolloids, 17: 25-39.

Dickinson, E., Flint, F. O. & Hunt, J. A. (1989) "Bridging flocculation in binary protein stabilized emulsions." Food Hydrocolloid, 3(5): 389-397.

Dickinson, E., Hunt, J. A. & Horne, D. S. (1992) "Calcium induced flocculation of emulsions containing adsorbed β -casein or phosvitin." Food Hydrocolloid, 6(4): 359-370.

Dickinson, E., Rolfe, S. E. & Dalgleish, D. G (1990) "Surface shear viscometry as a probe of protein-protein interactions in mixed milk protein films adsorbed at the oil-water interface" International Journal of Biology Macromolecules, 12.

Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B. & Roberfroid, M. B. (1999) "Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document." British Journal of Nutrition, CABI Publishing, Oxford, UK, 81: S1-S27.

Diplock, A. T., Charleux, J., Crozier-Willi, G., Kok, F., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stah, W. & Viña-Ribes, J. (1998) "Functional food science and defense against reactive oxidative species." British Journal of Nutrition, 80 (1): S77-S112.

Donnelly, J. L., Decker, E. A. & McClements, D. J. (1998) "Iron-catalyzed oxidation of menhaden oil as affected by emulsifiers." Journal of Food Science, 63: 997-1000.

Dressman, J. B., Berardi, R. R., Dermentzoglou, L. C., Russell, T. L., Schmaltz, S. P., Barnett, J. L. & Jarvenpaa, K. M. (1990) "Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women." Pharmaceutical Research, 7: 756-761.

Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J. & Boobis, A. (2002) "Methods of in vitro toxicology" Food Chemistry and Toxicology, 40(2): 193-236.

Elias, E. J., McClements, D. J. & Decker, E. A. (2005) "Antioxidant activity of cysteine, tryptophan and methionine residues in continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 10248-10253.

Escudero, N. L., Arellano, M. L., Luco, J. M., Gimenez, M. S. & Mucciarelli, S. I. (2004) "Comparison of the chemical composition and nutritional value of Amaranth cruentus flour and its protein concentrate." Plant Food for Human Nutrition, 59 (1): 15-21.

Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H. & Jurgens, G. (1992) "The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL." Free Radicals in Biology and Medicine, 13, 341 -390.

Evans, D. F. & Wennerström, H. (1994) "The Colloidal Domain. Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet." VCH Publishers, New York.

- Fang, Y. Z. & Dalgleish, D.G. (1993) "Dimensions of the adsorbed layers in oil-in-water emulsions stabilized by caseins." Journal of Colloid Interface Science, 156: 329-334.
- Fang, Y. Z., Yang, S. & Wu, G. W. (2002) "Free radicals, antioxidants, and nutrition". Nutrition, 18(10): 872-879.
- Faraji, H., McClements, D. J & Decker, E. A. (2004) "Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 4559-4564.
- Fei, V., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., Leibach, F., Romero, M. F., Singh, S. K., Boron, W. & Hediger, M. (1994) "Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter." Nature, 368:563-566.
- Fenton, H. J. H. (1894) "The oxidation of tartaric acid in the presence of iron." Journal of Chemical Society, 10: 157-158.
- Fernandes, S. E., Gomes, A., Costa, D. & Lima, J. (2005) "Pindolol is a potent scavenger of reactive nitrogen species" Life Science, 77:1983-1992.
- Fisher, R. B. & Parsons, D. S. (1949) "A preparation of surviving rat small intestine for the study of absorption." Journal of Physiology, 110: 36-46.
- Fogh, J., Fogh, J. M. & Orfeo, T. (1977) "One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice." Journal of National Cancer Institute, 59: 221-226.
- Franco, J. M., Berjano, M., Guerrero, A., Muñoz, J. & Gallegos, C. (1995) "Flow Behavior and Stability of Light Mayonnaise containing a mixture of egg-yolk and sucrose atearate as emulsifiers." Food Hydrocolloids, 9: 111.
- Frankel, E. N. (2005) "Lipid oxidation." Bridgwater, England: The Oily Press LTD, 486.
- Frankel, E. N. & Meyer, A. S. (2000) "Review. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants" Journal of the Science of Food and Agriculture, 80: 1925-41
- Freer, E. M., Yim, K. S., Fuller, G. C. & Radke, C. J. (2004) "Interfacial rheology of globular and flexible proteins at the hexadecane/water interface: Comparison of shear and dilatation deformation." Journal of Physical Chemistry B, 1008: 3835-3844.
- Fridovich, I. (1976) "Free radicals in Biology" Academic Pres, New York, 1: 1976.
- Friedman, M. (1994) "Improvement in food safety by SH-containing aminoacids and peptides." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42: 3-20.

Fu, X. (2003) "Effect of plant leaf protein on lipotropy peroxidase system of rats." Chinese Journal of Veterinary Science, 11: 49-50.

Gallegos, C., Sanchez, M. C., Guerrero, A. & Franco, J. M. (1996) "Effect of process parameters on the rheological properties of O/W emulsions." *Asme applied mechanics division-publications-amd*, 217: 177-184.

Ganapathy, V. & Leibach, F. H. (1999) "Protein digestion and assimilation." Textbook of Gastroenterology, 456-467.

Ganapathy, V. & Leibach, F. H. (1983) "Role of pH and membrane potencial in dipeptide transport in intestinal and renal brush border membrane vesicles from the rabbit. Studies with L-carnosine and glycyl-L-proline." The Journal of Biological Chemistry, 258: 189-192.

García Fillería, S. F. & Tironi, V. A. (2015) "Application of amaranth protein isolate and hydrolysate on a reduced salt fish restructured product: antioxidant properties, textural and microbiological effects." International Journal of Food Science and Technology.

Gardner, M. L. G. (1984) "Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet - a neglected field?." Biological Reviews, 59: 289-331.

Genot, C., Berton, C. & Ropers, M. H. (2013) "The role of the interfacial layer and emulsifying proteins in the oxidation in oil-in-water emulsions." *Lipid Oxidation: Challenges in Food Systems*, ed. A. Logan, U. Nienaber & X. Pan, AOCS Press, Urbana, IL.

Gibbs B. F., Zougman, A., Masse, R. & Mulligan, C. (2004) "Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food." Food Research International, 37: 123-131.

Gorinstein, S., Delgado-Licon, E., Pawelzik, E., Permady, H.H., Weisz, M. & Trakhtenberg, S. (2001) "Characterization of Soluble Amaranth and Soybean Proteins Based on Fluorescence, Hydrophobicity, Electrophoresis, Amino Acid Analysis, Circular Dichroism and Differential Scanning Calorimetry Measurements." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49 (5): 595 - 601.

Gorinstein, S., Moshe, R., Greene, L. J. & Arruda, P. (1991) "Evaluation of four amaranthus species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39: 951-954.

Gorinstein, S., Vargas, O. J. M., Jaramillo, N. O., Salas, L. A., Ayala, A. L. M. & Arancibia, A. P. (2007) "The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals." European Food Research And Technology, 225 (34): 321-328.

Gorinstein, S., Zemser, M., Fliess, A., Shnitman, I., Parede-López, O., Yamamoto, K., Kobayashi, S. & Taniguchi, H. "Computational analysis of the amino acid residue sequences of amaranth and some other proteins." Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 62 (10)1: 1845-1851.

Grigoriev, D. O. & Miller, R. (2009) "Mono and multilayer covered drops as carriers." Current Opinions in Colloid and Interface Sciences, 14: 48-59.

Grimble, G.K. (2000) "Mechanisms of peptide and amino acid transport and their regulation" Proteins, Peptides and Amino Acids in Enteral Nutrition, 63-88.

Gu, Y., Majumder, K. & Wu, J. (2011) "QSAR-aided in silico approach in evaluation of food proteins as precursors of ACE inhibitory peptides." Food Research International, 44: 2465-2474

Guiotto, E. N. (2014) "Aplicación de subproductos de chía (*Salvia hispanica* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.) en alimentos." Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Guyton, A.C. (1991) Textbook of medical physiology. W. B. Saunders, Philadelphia, PA.

Guzey, D. & McClements, D. J. (2007) "Impact of electrostatic interactions on formation and stability of emulsions containing oil droplets coated by beta-lactoglobulin-pectin complexes." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 475-485.

Haber, F. & Weiss, J. (1934) "The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts." Proceeding of the Royal Society of London, 147: 332-351.

Halling, P. J. (1981) "Protein-stabilized foams and emulsions." Critical reviews in food science and nutrition, 15: 155-203.

Halliwell, B. (1997) "Antioxidants and human disease: a general introduction." Nutrition Reviews, 55: 44-49.

Halliwell, B. (2001) "Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment." Drugs Aging, 18: 685-716.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1990) "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." Methods on Enzymology, 186: 1-85.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1992) "Biologically relevant metal ion dependent OH[•] generation. An update." Journal of the Federation of European Biochemical Societies, 307, 108.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1999) "Free Radicals in Biology and Medicine." Clarendon Press, Oxford.

Halliwell, B. & Whiteman, M. (2004) "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?." British Journal of Pharmacology, 142: 231-255.

Hansch, C. & Leo, A. (1995) "Exploring QSAR: Fundamentals and Application in Chemistry and Biology." American Chemical Society, Washington DC.

Hartmann, R. & Meisel, H. (2007) "Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications." Current Opinion in Biotechnology, 18: 163-169.

Hashimoto, K. & Shimizu, M. (1993) "Epithelial properties of human intestinal Caco-2 cells cultured in serum-free medium" Cytotechnology, 13:175-184.

Hattori, M., Yamaji-Tsukamoto, K. A., Kumagai, H., Feng, Y. & Takahashi, K. (1998) "Antioxidative activity of soluble elastin peptides." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 2167-2170.

Haug, I. J., Skar, H. M., Vegarud, G. E., Langsrud, T., & Draget, K. I. (2009) "Electrostatic effects on β -lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry." Food Hydrocolloids, 23(8): 2287-2293.

Hazra B., Biswas S. & Mandal, N. (2008) "Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*." BMC Complementary and Alternative Medicine, 8:63-73.

He, Y., Chen, J., Ren, J., Wang, G. & Cai, G. (2002) "Type I collagen inhibits hydroxyl radical-induced apoptosis." Journal of Biochemistry, 132: 373-379.

Helmholtz, H. L. F. (1879) "Studies of electric boundary layers." Wied. Ann, Phys Chem, 7: 337-382

Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M. & Recio, I. (2004). "Application of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion." Journal of Chromatography – A, 1049: 107-114.

Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I. & Bartolomé, B. (2007) "ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from β -lactoglobulin f(19-25). Interactions with ascorbic acid." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 3392-3397.

Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B. & Amigo, L. (2005) "Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from β -lactoalbumin and β -lactoglobulin. Identification

of active peptides by HPLC-MS/MS." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 588-593.

Heymann, M., Crain-Denoyelle, A., Nath, S. & Desjeux, J. (1990) "Quantification of protein transcytosis in the human colon carcinoma cell line Caco-2." Journal of Cellular Physiology, 143: 391-395.

Hidalgo, I., Ruba, T. & Borchardt, R. (1989) "Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability." Gastroenterology, 96:736-749.

Hiemenz, P. C. (1986) "Principles of Colloid and Surface Chemistry." 2nd edn Marcel Dekker, New York (USA), 13: 737.

Hillgren, K. M., Kato, A. & Borchardt, R. (1995) "In vitro systems for studying intestinal drug absorption." Medicinal Research Reviews, 15(2): 83-109.

Himukai, M. & Hoshi, T. (1980) "Mechanism of glycyl-L-leucine uptake by guinea-pig small intestine: relative importance of intact-peptide transport." Journal of Physiology, 302: 155-169

Horn, A. F., Nielsen, N. S. & Jacobsen, C. (2009) "Additions of caffeic acid, ascorbyl palmitate or α -tocopherol to fish oil-enriched energy bars affect lipid oxidation differently." Food Chemistry, 112: 412-420.

Hosoya, H., Kim, K. J. & Lee, V. H. L. (1996) "Age-dependant expression of P-glycoprotein gp 170 in Caco-2 cell monolayers." Pharmaceutical Research, 13: 885-890.

Hoyland, D. V. & Taylor A. J. (1991) "Thermal stability of fish myofibrils: a differential calorimetric study." International Journal of Food Science and Technology, 26, 283.

Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. & Prior, R. (2002) "High-throughput assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 4437-4444.

Hughes, M. & Nicklin, H. (1968) "The chemistry of peroxy-nitrites. Part I: Kinetics of decompositions of peroxy-nitrous acid." Journal of the Chemical Society, A:450-452.

Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A. & McClements, D. J. (2011) "In vitro human digestion models for food applications." Food Chemistry, 125: 1-12.

ILSI Europe (2002) "Conceptos sobre alimentos funcionales."

ILSI North America Technical Committee on Food Components for Health Promotion (1999).

Irvine, J. D., Takahashi, L., Lockhart, K., Cheong, J., Tolan, J. W., Selick, H. E. & Grove, J. R. (1999) "MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells: A tool for membrane permeability screening." Journal of Pharmacological Science, 88(1): 28-33.

Israelachvili, J. N. (1992) "Intermolecular and Surface Forces." Academic Press, Londres (UK).

Israelachvili, J. N. & Wennerström, H. (1996) "Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions." Nature, 179-219.

Janzen, E.G. (1971) "Spin trapping." Accounts of Chemical Research, 4(1): 31-40.

Je, J. Y., Park, P. J. & Kim, S. K. (2005) "Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate" Food Research International, 38(1): 45-50.

Jimenez, N., Gonzalez, M., Fernandez, C. & Lopez, J. (2002) "Estudio de la biocompatibilidad in vitro de polímeros metacrílicos derivados de pirrolidona/ina." Biomecánica, 15:63-71.

Johnson, L. R. (2002) "Gastrointestinal Physiology." Sixth Edition, St. Louis, Mosby.

Jung, W. K., Qian, Z. J., Lee, S. H., Choi, S. Y., Sung, N. J. & Byun, H. G. (2007) "Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide isolated from in vitro gastrointestinal digests of *Mytilus coruscus*." Journal of Medicinal Food, 10:197-202.

Kabalnov, A. S. & Shchukin, E. D. (1992) "Ostwald ripening theory: applications to fluorocarbon emulsion stability." Advance Colloid Interface Science, 38: 69-97

Kanazawa, A., Sawa, T., Akaike, T. & Maeda, H. (2002) "Dietary lipid peroxidation products and DNA damage in colon carcinogenesis." European Journal on Lipid Science Technology, 104: 439-447

Kayashita, J., Shimaoka, I., Nakajoh, M., Yamazaki, M. & Kato, N. (1997) "Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility." Journal of Nutrition, 127: 1395-1400.

Kedjarune, U., Migasena, P., Changbumrung, S., Pongpaew, P. & Tungtrongchitr, R. (1997) "Flow rate and composition of whole saliva in children from rural and urban Thailand with different caries prevalence and dietary intake." Caries Research, 31: 148-154.

- Kerns, E. H., Di, L., Petuski, S., Farris, M., Ley, R. & Jupp, P. (2004) "Combined applications of parallel artificial membrane permeability assays in drug discovery." Journal of Pharmaceutical Science, 93: 1440-1453.
- Kim, G. N., Jang, H. & Kim, C. I. (2007) "Antioxidant capacity of caseinophosphopeptides prepared from sodium caseinate using Alcalase." Food Chemistry, 104: 1359-1365.
- Kim, S. K., Kim, Y. T., Byun, H. G., Nam, K. S., Joo, D. S. & Shahidi, F. (2001) "Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 1984-1989.
- King, R., Hirst, J. & Sternberg, M. (1993) "New approaches to QSAR: neural networks and machine learning." Perspectives in Drug Discovery and Design, 1: 279-290.
- Klimczak, M. M. & Pacholek, B. (2002) "Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds" Nahrung, 46 (3): 184-186.
- Knipp, G. T., Vander Velde, D. G., Siahaan, T. J. & Borchardt, R. T. (1997) "The effect of β -turn structure on the passive diffusion of peptides across Caco-2 cell monolayers" Pharmaceutical Research, 14: 1332-1340.
- Kohen, R. & Nyska, A. (2002) "Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification." Toxicologic Pathology, 30(6): 620-650.
- Konishi, Y., Fumita, Y., Okuno, K. & Fuwa, H. (1985) "Isolation and characterization of globulin from seeds of *amaranthus hypochondriacus*." Agricultural and Biological Chemistry, 49, 6-10.
- Konishi, Y., Horikawa, K., Oku, Y., Azumaya, J. & Nakatani N. (1991) "Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains." Agricultural and Biological Chemistry, 55, 2745-2750.
- Kooy, N., Royall, J. & Ischropoulos, H. (1997) "Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite." Free Rad Research, 27:245-254
- Labuza, T. P., McNayli, L., Gallagher, D., Hawekes, J. & Hurtado, F. (1972) "Stability of intermediate moisture foods." Lipid Oxidation, Journal of Food Science, 37: 154-159.
- Let, M. B., Jacobsen, C., Sorenson, A. D. M. & Meyer, A. S. (2007) "Homogenization conditions affect the oxidative stability of fish oil enriched milk emulsions: Lipid oxidation." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 1773-1780.

Lethuaut, L., Metro, F. & Genot, C. (2002) "Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil-in-water emulsions stabilized by protein." Journal of American Chemistry of Oil Society, 79: 425-430.

Levine, R.R., McNary, W.F., Fornguth, P.J & Leblanc, R. (1970) "Histological re-evaluation of everted gut technique for studying intestinal absorption." European Journal of Pharmacology, 9: 211-219.

Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B. & Wu, Y. (2007) "Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry." Food Chemistry, 102: 1135-1143.

Li, Y-W & Li, B. (2013) "Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: key sequence positions and their amino acids properties." Journal of Theoretical Biology, 318: 29-43.

Liang, R., Fei, Y., Prasad, P., Ramamoorthy, S., Han, H., Yang-Feng, T., Hediger, M., Ganapathy, V. & Leibach, F. (1995) "Human intestinal H⁺/peptide cotransporter." Journal Biological Chemistry, 270: 6456-6463.

Lindberg Madsen, H. & Bertelsen, G. (1995) "Spices as antioxidants." Trends in Food Science and Technology, 6: 271-278.

Linxiang, L., Abe, Y., Kanagawa, K., Shoji, T., Mashino, T., Mochizuki, M., Tanaka, M. & Miyata, N. (2007) "Iron-chelating agents never suppress Fenton reaction but participate in quenching spin-trapped radicals." Analytica Chimica Acta, 599: 315-319.

Lipkin, A., Anisimova, V., Nikonorova, A., Babakov, A., Krause, E., Bienert, M., Grishin, E. & Egorov, T. (2005) "An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds." Phytochemistry, 66(20): 2426-2431.

Liu, Q., Raina, A. K., Smith, M. A., Sayre, L. M. & Perry, G. (2003) "Hydroxynonenal, toxic carbonyls and Alzheimer disease." Molecular Aspects of Medicine, 24: 305-313.

Liu, R. H., Eberhardt, M. V. & Lee, C. Y. (2001) "Antioxidant and antiproliferative activities of selected New York apple cultivars." NY Fruit Q, 9: 15-17.

Liyana-Pathirana, C. M. & Shahidi, F. (2007) "Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions." Food Chemistry, 101 (3): 1151-1157.

Long, E. K., Murphy, T. C., Leiphon, L. J., Watt, J., Morrow, J. D., Milne, G. L., Howard, J. R. H. & Picklo, M. J. (2008) "Trans-4-hydroxy-2-hexenal is a neurotoxic product of docosahexaenoic (22:6; n-3) acid oxidation." Journal of Neurochemistry, 105: 714-724.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent." Journal Biological Chemistry, 193: 265-275.

Lu, S., Deng, P., Liu, X., Luo, J., Han, R., Gu, X., Liang, S., Wang, X., Li, F., Lozanov, V., Patthy, A. & Pongor, S. (1999) "Solution structure of the major α - amylase inhibitor of the crop plant amaranth." The Journal of Biological Chemistry, 274 (29): 20473-20478.

Luis Miguel, J., Llovet, A. & Elisei, J. (2011) "El cultivo de amaranto." INTA Estación Experimental Agropecuaria Pergamino "Ingeniero Agrónomo Walter Kugler" <http://www.inta.gov.ar/pergamino>.

Ma, Y., Xiong, Y., Zhai, J., Zhu, H. & Dziubla, T. (2010) " Fractionation and evaluation of radical scavenging peptides from in vitro digests of buckwheat protein." Food Chemistry, 118: 582-588.

Mahmoudi, N., Axelos, M. A. V. & Riaublanc, A. (2011) "Interfacial properties of fractal and spherical whey protein aggregates." Soft Matter, 7: 7643-7654.

Mantle, D., Anderton, J. G., Falkous, G., Barnes, M., Jones, P. & Perry, E. (1998) "Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils." Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 121, 385-391

Marcone, M. (1999) "Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S globulins." Food Research International, 32: 79-92.

Marcone, M. F. & Yada, R. Y. (1991) "Isolation, purification and characterization of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*." Agricultural and Biological Chemistry, 55 (9) :2281-2289.

Marcone, M. F. & Yada, R. Y. (1992) "Study of the charge profile and covalent subunit association of the oligomeric seed globulin from *amaranthus hypochondriacus*." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 385-389.

Marcone, M. F. & Yada, R. Y. (1998) "Structural analysis of globulins isolated from genetically different *Amaranth* hybrid lines." Food Chemistry, 61 (3) :319-326.

Márquez-Ruiz, G. (2008) "Oxidação Lipídica em Alimentos: Avaliação Analítica e Nutricional. Estratégias para sua Prevenção." En: III Simpósio Internacional: Tendencias e Innovaciones en Tecnología de Aceites y Grasas, Campinas, Sao Paulo (Brasil).

Martínez, E. N. (1997) "Caracterización de las proteínas de amaranto." Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional De La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Martínez, E. N. & Añón, M.C. (1996). "Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 2523-2530.

Martínez, E. N., Castellani, O. F. & Añón, M. C. (1997) "Common molecular features among amaranth storage proteins." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 3832-3839.

Martirosyan, D. M., Miroshnichenko, L. A. & Kulakova, S.N. (2007) "Amaranth oil application for coronary heart disease and hipertensión" Lipids Research and Disease, 6 (1): 1-12.

Matthäus, B. (2002). "Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds" Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(12): 3444-3452.

Mayne, S.T. (2003) "Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research." Journal of Nutrition, 133: 933S-940S.

McClements, D. J. (1999) "Food Emulsions: principles, practice and techniques." Ed. CRC Press, New York (USA).

McClements, D. J. (2005) "Food emulsions: principles, practices, and techniques." 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press.

McClements, D. J. & Decker, E. A. (2000) "Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems." Journal of Food Science, 65: 1270-1282.

Medina, I., Undeland, I., Larsson, K., Storro, I., Rustad, T., Jacobsen, C., Kristinova, V. & Gallardo, J. M. (2012) "Activity of caffeic acid in different fish lipid matrices: A review." Food Chemistry, 131: 730-740.

Mei, L. Y., Decker, E. A. & McClements, D. J. (1998) "Evidence of iron association with emulsion droplets and its impact on lipid oxidation." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 5072-5077.

Meisel, H. & FitzGerald, R. J. (2003) "Biofunctional properties from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects." Current Pharmaceutical Design, 9: 1289-1295.

Mendis, E., Rajapakse, N. & Kim, S. K. (2005) "Antioxidant properties of a radicalscavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(3): 581-587.

- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. & Kim, S. (2005) "Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their *in vitro* antioxidant effects." Life Science, 70: 2166-2178.
- Minetti, M., Pietraforte, D., Di Stazi, A. & Mallozi, C. (1996) "Nitric oxide-dependent NAD linkage to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: possible involvement of a cysteine thiyl radical intermediate." Biochemistry Journal, 319: 369 - 375.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba M. & Darewicz, M. (2008) "BIOPEP and other programs processing bioactive peptide sequences." Journal of AOAC, 91: 965-980.
- Miret, S., Abrahamse, L. & de Groene, E. (2004) "Comparison of *in vitro* models for prediction of compound absorption across the human intestinal mucosa." Journal of Biomolecular Screening, 9(7): 598-606.
- Mizuno, S., Nishimura, S., Matsuura, K., & Gotou, T. (2004) "Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease." Journal of Dairy Science, 87: 3183-3188.
- Molina, M. I., Circosta, A., Añón, M. C. & Petrucci, S. (2008) "Mature *Amaranthus hypochondriacus* seeds contain non-processed 11S precursors." Phytochemistry, 69: 58-65.
- Moore, J., Yin, Y. & Yu, L. (2006) "Novel fluorometric assay for hydroxyl radical scavenging capacity (HOSC) estimation." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54:617-626.
- Mora-Escobedo, R., Paredes-López, O. & Odorica-Falomir, C. (1990) "Characterization of albumins and globulins from Amaranth." LWT- Food Science and Technology, 23: 484-487.
- Moure, A., Domínguez, H. & Parajo, J. (2006) "Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates." Process Biochemistry, 41: 447-456.
- Mukhopadhyay, S., Luthria, D.L. & Robbins, R.J. (2006) "Optimization of extraction process for phenolic acids from cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction" Journal of the Science of Food and Agriculture, 86: 156-162.
- Muñiz, P., Sáez, G. & Valls, V. (2000) "Función y mecanismos antioxidantes. Importancia durante la transición feto-neonato." Radicales libres y estrés oxidativo en biomedicina importancia y utilidad de los antioxidantes en la prevención de procesos fisiopatológicos relacionados, Ed. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados, 63- 70.

Nakajima, A., Matsuda, E., Matsuda, Y., Sameshima, H. & Ikenoue, T. (2012) "Characteristics of the spin-trapping reaction of a free radical derived from AAPH: further development of the ORAC-ESR assay." Analytical Bioanalytical Chemistry, 403: 1961-1970.

Nakamura, R., Konishi, Y., Kojima, A. & Nakatani, N. (1998) "Globulin and albumin-2 associated with protein bodies in *Amaranthus cruentus* seeds." Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 62 (6): 1231-1233.

Natoli, M., Leoni, B. D., D'Agnano, I., D'Onofrio, M., Brandi, R., Arisi, I., Zucco, F. & Felsani, A. (2011) "Cell growing density affects the structural and functional properties of Caco-2 differentiated monolayer." Journal of Cell Physiology, 226: 1531-1543.

Nawar, W. W. (1996) "Lipids." Food Chemistry, Chapter 15, O. Fennema Ed., USA.

Nellans, H. N. (1991) "Mechanism of peptide and protein absorption via paracellular intestinal transport: modulation of absorption." Advanced Drug Delivery Review, 7: 339-364.

Nenadis, N., Zhang, H.Y. & Tsimidou, M.Z. (2003) "Structure-antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: Effect of carbon side chain characteristic groups." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 1874-1879.

Nkongue, C. & Balance, M. (1982) "A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in micro-kjeldahl digests." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30: 416-420.

Noguchi, N., Watanabe, A. & Shi, H. (2000) "Diverse Functions of Antioxidants." Free Radicals Research, 33: 809-817.

Nsimba, R. Y., Kikuzaki, H. & Konishi Y. (2008) "Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. Seeds." Food Chemistry, 106: 760-766.

Oliveira, M. & Minotto, J. (2010) "Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species." Pharmacie Reports, 62:185-193.

Osborne, T. (1924) "The Vegetable Protein." New York, Longmans & Green Ed.

Osborn, H. & Akoh, C. C. (2004) "Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipidbased oil-in-water emulsions." Food Chemistry, 84: 451-456.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M. & Prior, R. (2001) "Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay using fluorescein as the fluorescent probe." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 4619-4626.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E., Prior, R. & Huang, D. (2002) "Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 2772-2777.

Palazolo, G. G. (2006) "Formación y estabilidad de emulsions o/w preparadas con proteínas nativas y desnaturalizadas de soja." Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Pappenheimer, J. R., Dahl, C. E., Karnovsky, M. L. & Maggio, J. E. (1994) "Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D-aminoacids." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 91: 1942-1945.

Paredes-López, O. (1994) "Amaranth: biology, chemistry and technology." CRC Press.

Paredes-López, O., Mendoza, V. & Mora R. (1993) "Isolation of amaranth flour proteins by fractionation procedures and sonication." Plant Food for Human Nutrition, 43: 37-43.

Paredes Salido, F. & Roca Fernandez, J.J. (2002) "Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular." OFFARM, 21: 96-100.

Park, P. J., Jung, W. K., Nam, K. S., Shahidi, F. & Kim, S. K. (2001) "Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk." Journal of American Oil Chemistry Society, 78: 651-656.

Patel, R.P., Mollering, D, Murphy-Ullrich, J., Jo, H., Beckman, J.S. & Darley-USmar, V.M. (2000) "Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis." Free Radical Biology and Medicine, 28: 1790-1794.

Pauletti, G. M., Okumu, F. W. & Borchardt, R. T. (1997) "Effect of size and charge on passive diffusion of peptides across Caco-2 monolayers via the paracellular pathway." Pharmaceutical Research, 14: 164-168.

Peña-Ramos, E. & Xiong, Y. (2003) "Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties." Meat Science, 64: 259-263.

Peña-Ramos, E., Xiong, Y. & Arteaga, G. (2004) "Fractionation and characterization for antioxidant activity of hydrolyses whey protein." Journal of the Science of Food and Agriculture, 84: 1908-1918.

- Petersen, D.R. & Doorn, J.A. (2004) "Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets." Free Radical Biology and Medicine, 37: 937-945.
- Philanto, A. (2006) "Antioxidative peptides derived from milk proteins." International Dairy Journal, 16: 1306-1313.
- Philanto-Leppala, A. (2000) "Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory." Trends in Food Science and Technology, 11: 347-356.
- Phipps, L. W. (1985) "The high pressure dairy homogenizer." National Institute for Research in Dairying.
- Pichot, R., Spyropoulos, F. & Norton, I.T. (2010) "O/W emulsions stabilised by both low molecular weight surfactants and colloidal particles: the effect of surfactant type and concentration." Journal of Colloid Interface Science, 352: 128-135.
- Pietta, P.G. (2000) "Flavonoids as antioxidants" Journal of Natural Products, 63:1035-1042.
- Plate, A. & Arêas, J. (2002) "Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits." Food Chemistry, 76.
- Pokorny, J. (2003) "Problèmes de stabilité des produits alimentaires li' es `a la presence des lipides." In: Graille J, editor. Lipides et corps gras alimentaires. Paris: Lavoisier. 51-75.
- Porter, P. A., Osiecka, R. T. Borchardt, J. A. Fix, L., Frost, A. & Gardner, C. (1985) "In vitro drug absorption models. II. Salicylate, cefoxitin, α -methyldopa and theophylline uptake in cells and rings: Correllation with in vivo bioavailability." Pharmaceutical Research, 6: 293-298.
- Possel, H., Noack, H., Augustin, W., Keilhof, G. & Wolf, G. (1997) "2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation." FEBS Letters, 416:175-178.
- Prakash, D. & Pal M. (1991) "Nutritional and antinutritional composition of vegetable and grain amaranth leaves." Journal of Science in Food Agriculture, 57: 573-585.
- Prior, R.L., Wu, X. & Schaich, K. (2005) "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements" Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 4290-302
- Qian, Z., Jung, W., Byun, H. & Kim, S. (2008) "Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage." Bioresource Technology, 99: 3365-3371.

Qian, Z., Jung, W. & Kim, S. (2008) "Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin." Bioresource Technology, 99:1690-1698.

Quiros, A., Davalos, A., Lasuncion, M. A. & Ramos, M. (2008) "Bioavailability of the antihypertensive peptide LHLPLP: Transepithelial flux of HLPLP." International Dairy Journal, 18: 279-286.

Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J. K. & Kim, S. K. (2005) "Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties." Food Research International, 38: 175-182.

Ramírez-Medelez, M. C., Aguilar, M. B., Miguel, R. N., Bolaños-García, V. M., García-Hernández, E. & Soriano-García, M. (2003) "Amino acid sequence, biochemical characterization, and comparative modeling of a nonspecific lipid transfer protein from *Amaranthus hypochondriacus*." Archives of Biochemistry and Biophysics, 415: 24-33.

Ranaldi, G., Consalvo, R., Sambuy, Y. & Scarino, M. L. (2003) "Permeability characteristics of parental and clonal human intestinal Caco-2 cell lines differentiated in serum-supplemented and serum-free media." Toxicology in vitro, 17: 761-767.

Rawle, A. (2005) "Basic principles of particle size analysis." Malvern Instruments Limited, technical paper.

Re, R., Pellegrini, A., Proteggente, A., Pannala, M., Yang, C. & Rice-Evans, C. (1999) "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." Free Radicals in Biology and Medicine, 26: 1231-1237.

Reaven, P. D. & Witztum, J. L. (1996) "Oxidized low density lipoproteins in atherogenesis: role of dietary modification." Annual Reviews in Nutrition, 16: 51-71.

Regazzo, D., Molle, D., Gabai, G., Tome, G., Dupont, D., Leonil, J. & Boutrou, R. (2010) "The (193-209) 17 residues peptide of bovine b-casein is transported through Caco-2 monolayer." Molecular Nutrition and Food Research, 54: 1-8.

Reinecke, S. A. & Helling, B. (2002) "Lysosomal response of earthworm (*Eisenia foetida*), coelomocytes to the fungicide copper oxychloride and relation to life-cycle parameters." Environmental Toxicology Chemistry, 21: 1026-1031.

Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L. & Chuang, G.G. (1995) "A review of the evidence supporting melatonin as antioxidant." Journal of Pineal Research, 18: 1-11.

Repetto, M. (2002) "Toxicología fundamental. Métodos alternativos." Toxicidad in vitro, Ed. Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group, 303-305.

Riemersma, R. A. (2002) "Analysis and possible significance of oxidised lipids in food." European Journal of Lipid Science and Technology, 104: 419-420.

Robertfroid, M. B. (2000) "Defining Functional Foods." Woodhead Publishing Ltd., Combridge, UK.

Roesler, K. R. & Rao, A. G. (2001). "Rapid gastric fluid digestion and biochemical characterization of engineered proteins enriched in essential amino acids." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 3443-3451.

Rubas, W., Cromwell, M.E., Shahrokh, Z., Villagran, J., Nguyen, T. N., Wellton, M., Nguyen, T. H. & Mrsny, R. J. (1996) "Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestine tissue." Journal of Pharmaceutical Science, 85: 169-169.

Sabbione, A. C., Scilingo, A. A. & Añón, M. C. (2015) "Potential antithrombotic activity detected in Amaranth proteins and its hydrolysates." LWT-Food Science and Technology, 60(1): 171-177.

Saiga, A., Tanabe, S. & Nishimura, T. (2003) "Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(12): 3661-3667.

Saito, H. & Unui, K. (1993) "Dipeptide transporters in apical and basolateral membranes of the human intestinal cell line Caco-2." American Journal of Physiology, 265: G289-G294.

Saito, K., Jin, D. H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E. & Yasuhara, T. (2003) "Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 3668-3674.

Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N. & Juneja, L. R. (2004) "Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in linoleic acid oxidation system" Food Chemistry, 86(1): 99-103.

Salcedo-Chávez, B., Osuna-Castro J. A., Guevara-Lara F., Domínguez-Domínguez J. & Paredes-López O. (2002) "Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds" Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 6515-6520.

Samaranayaka, A. & Li-Chan, E. (2008) "Autolysis assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*)." Food Chemistry, 107: 768-776.

Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A. & Zucco, F. (2005) "The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics." Cell Biology and Toxicology, 21: 1-26

Sánchez, M. C., Berjano, M., Guerrero, A. & Gallegos, C. (2001) "Evolución de la cinética de emulsificación y de las propiedades reológicas de emulsiones aceite vegetal en agua preparadas con dos tipos de agitadores." *Grasas Aceites*, 52: 222-228.

Sánchez, M. C., Berjano, M., Guerrero, A., Brito, E. & Gallegos, C. (1998) "Evolution of the microstructure and rheology of O/W emulsions during the emulsification process." Canadian Journal of Chemical Engineer, 76(3): 479-485.

Sánchez-Moreno, C. (2002) "Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems" Food Science and Technology International, 8, 3: 121-139

Sarmadi, B. & Ismail, A. (2010) "Antioxidative peptides from food proteins: a review." Peptides, 31: 1949-1956.

Satake, M., Enjoh, M., Nakamura, Y., Takano, T., Kawamura, Y., Arai, S. & Shimizu, M. (2002) "Transepithelial transport of bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers." Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 66: 378-384.

Saunders, R. & Becker, R. (1984) "Amaranthus: a potential food and feed resource. *Advances in Cereal Science and Technology*." Ed. Pomeranz, Y. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 357-397.

Savoie, L., Agudelo, R. A., Gauthier, S. F. & Marin, J. (2005) "In vitro determination of the release kinetics of peptides and free amino acids during the digestion of food proteins." Journal of AOAC International, 88: 935-948.

Schafer, F. Q. & Buettner, G. R. (2001) "Redox environments of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." Free Radical Biology and Medicine, 30:1191-1212.

Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). "Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa." Analytical Biochemistry, 166: 368-379.

Schmelzer, C. E. H., Schöps, R., Reynell, L., Ulbrich-Hofmann, R., Neubert, R. H. H., & Raith, K. (2007) "Peptic digestion of β -casein: Time course and fate of possible bioactive peptides." Journal of Chromatography A, 1166(1-2): 108-115.

Schubert, H. & Armbruster, H. (1992) "Principles of formation and stability of emulsions." International Journal of Chemical Engineering, 32(1): 14-28.

Segura-Nieto, M., Barba de la Rosa, A. & Paredes-López, O. (1994). "Biochemistry of amaranth proteins." Amaranth: Biology, Chemistry & Technology. Ed. CRC Press. Boca Raton(5): 75-106.

Segura-Nieto, M., Vázquez-Sánchez, N., Rubio-Velázquez, H., Olguin-Martínez, H., Rodríguez-Nester, C. E. & Herrera-Estrella L. (1992) "Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40 (9): 1553-1558.

Seiler, F., Rehn, B., Rehn, S., Hermann, M. & Bruch, J. (2001) "Quartz exposure of the rat lung leads to a linear dose response in inflammation but not in oxidative DNA damage and mutagenicity." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 24:492-498.

Shahidi, F. (1997) "Natural antioxidants: an overview." Natural Antioxidants, Cap. 1, Ed. Shahidi, F., AOCS Press, USA.

Shaich, K.M. (2005) "Lipid oxidation: theoretical aspects." In Bailey's industrial oil and fat products, Wiley Interscience Ed., USA.

Shimizu, M., Tsunogai, M. & Arai, S. (1997) "Transepithelial transport of oligopeptides in the human intestinal cell, Caco-2." Peptides, 18: 681-687.

Siddhuraju, P. (2006) "The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of 561 phenolics of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed 562 extracts." Food Chemistry, 99: 149-157.

Sies, H. (1993) "Strategies of antioxidant defence." European Journal of Biochemistry, 215: 213-219.

Silvestre, M.P.C., Chaiyasit, W., Brannan, R.G., McClements, D.J. & Decker, E.A. (2000) "Ability of surfactant headgroup size to alter lipid and antioxidant oxidation in oil-in-water emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 2057-2061.

Singh, H. (2011) "Aspects of milk-protein-stabilised emulsions." Food Hydrocolloids, 25: 1938-1944.

Singh, R. P., Murthy, K. N. & Jayaprakasha, G. K. (2002) "Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 81-86.

Siquet, C., Paiva-Martins, F., Lima, J. L., Reis, S. & Borges, F. (2006) "Antioxidant profile of dihydroxy and trihydroxyphenolic acids. A structure-activity relationship study" Free Radical Research, 40:433-42.

Sivapriya, M., & Srinivas, L. (2007) "Isolation and purification of a novel antioxidant protein from the water extract of Sundakai (*Solanum torvum*) seeds." Food Chemistry, 104: 510-517.

Smyth, D. H. & Taylor, C. B. (1957) "Transfer of water and solutes by an in vitro intestinal preparation." Journal of Physiology, 138: 632-648.

Soares, S. E. (2002) "Ácidos fenólicos como antioxidantes" Revista de Nutrição, Campinas, 15(1) 71-81.

Stoscheck, C. M. (1990) "Quantitation of protein." Methods in Enzymology, 182: 894.

Suetsuna, K., Ukeda, H. & Ochi, H. (2000) "Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein." Journal of Nutricional Biochemistry, 11(3) :128-130.

Sun, H., Liu, D., Li, S. & Qin, Z. (2009) "Transepithelial transport characteristics of the antihypertensive peptide, Lys-Va-Leu-Pro-Val-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayer." Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 73: 293-298.

Sutton, H. C. & Winterbourn, C. C. (1989) "On the participation of higher oxidation states of iron and cooper in Fenton reactions." Free Radical Biology and Medicine, 6: 53.

Tamura, K., Konstantinos, A. A., Vander Velde, D. G., Aube, J. & Borchardt, R. T. (1997) "Effect of stereochemistry on the transport of Aca-linked α -turn peptidomimetics across a human intestinal cell line." Bioorganic and Medicinal Chemistry, 5: 1859-1866.

Tan, C. T. (2004) "Beverage emulsions." *Food Emulsions*, Ed. S. Friberg, K. Larsson & J. Sjoblom.

Taylor, P. (1995) "Ostwald ripening in emulsions." *Colloids and Surfaces, Physicochemical and Engineering Aspects*, 99 (2): 175-185.

Thwaites, D., Brown, C., Hirst, B. & Simmons, L. (1993) "H⁺ - coupled dipeptide (glycylsarcosine) transport across apical and basolateral borders of human intestinal Caco-2 cell monolayers display distinctive characteristics." Biochimica et Biophysica Acta, 1151: 237-245.

Tironi, V. A. (2005) "Rancidez oxidativa en salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*). Interacción lípidos oxidados – proteínas." Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Tironi, V. A. & Añón, M. C. (2010). "Amaranth as a source of antioxidant peptides. Effect of proteolysis." Food Research International, 43: 315 – 322.

Tironi, V. A., Tomás, M. & Añón M. C. (2007) "Lipid and protein deterioration during the chilled storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*)."
Journal of Science in Food and Agriculture, 87 (12): 2239- 2246.

Tosi, E. A., Ré, E., Lucero, H. & Masciarelli, R. (2001) "Dietary fiber obtained from amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain by differential milling." Food Chemistry, 73 (4): 441-443.

Tsuji, A. & Tamai, I. (1996) "Carrier - mediated intestinal transport of drugs" Pharmacy Research, 13: 963-977.

Turco, L., Catone, T., Caloni, F., Di Consiglio, E., Testai, E. & Stamatii, A. L. (2011) "Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: how reliable is this in vitro model for prediction of the oral dose fraction absorbed in human?" Toxicology in vitro, 25: 13-20.

Turner, R., McLean, C.H. & Silvers, K.M. (2006) "Are the health benefits of fish oils limited by products of oxidation?." Nutrition Research Reviews, 19: 53-62.

Udenigwe, C. C. & Aluko, R. E. (2012) "Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing and Potencial Health Benefits." Journal of Food Science, 71: 11-24.

Ursini, F., Zamburlini, A., Cazzolato, G., Maiorino, M., Bittolo Bon, G. & Sevanian, A. (1998) "Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis." Free Radicals Biology and Medicine, 25: 250-252.

Vachon, P.H. & Beaulieu, J.F. (1992) "Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line." Gastroenterology, 103: 414-423.

Valdes-Rodríguez, S., Segura-Nieto, M., Chagolla-López, A., Verver y Vargas-Cortina, A., Martínez-Gallardo, N. & Blanco-Labra, A. (1993) "Purification, characterization and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from Amaranth (*A. hypochondriacus*) seeds." Plant Physiology, 103: 1407-1412

Van Aken, G. A. (2004) "Coalescence mechanisms in protein-stabilized emulsions." In S. Friberg, K. Larsson & J. Sjoblom Ed., Food Emulsions, New York.

Vasco-Méndez, N. L. & Paredes-López, O. (1995) "Antigenic homology between amaranth glutelins and other storage proteins." *Journal of Food Chemistry*, 18: 227-238.

Vecchi, B. & Añón, M.C. (2009) "Two novel antihypertensive tetrapeptides from *Amaranthus Hipochondriacus* 11S globulin." *Pytochemistry*, 70: 864-870.

Ventureira, J. L. (2010). "Propiedades estructurales y funcionales de preparados proteicos de amaranto modificados y soja-amaranto." Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Ventureira, J. L., Martínez, E. N. & Añón, M. C. (2010) "Stability of oil: Water emulsions of amaranth proteins. Effect of hydrolysis and pH." *Food Hydrocolloids*, 24: 551-559.

Vermeirssen, V., Deplancke, B., Tappenden, K. A. & Van Camp, J. (2002) "Intestinal transport of the lactokinin Ala-LeuPro-Met-His-Ile-Arg through a Caco-2 Bbe monolayer." *Journal of Peptide Science*, 8: 95-100.

Vermeirssen, V., Van Camp, J. & Verstraete, W. (2004) "Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides: a review." *British Journal of Nutrition*, 92: 357-366.

Vermeirssen, V., Van Camp, J., Devos, L. & Verstraete, W. (2003) "Release of Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity during in vitro gastrointestinal digestion from batch experiment to semicontinuous model." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5680-5687.

Vidal, J. (1993) "Aspectos Experimentales de la Resonancia Paramagnética Electrónica, Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica" *Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco*, 1ª edición: 73 - 96.

Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Troncoso, A.M. & García-Parrilla, M.C. (2005) "Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro" *Analytica Chimica Acta*, 538: 391-98

Villière, A., Viau, M., Bronnec, I., Moreau, N., & Genot, C. (2005) "Oxidative stability of bovine serum albumin- and sodium caseinate-stabilised emulsions depends on metal availability." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1514-1520.

Vinqvist, M. R. & Barclay, L. R. (2000) "On the antioxidant mechanism of curcumin: classic methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity." *Organic Letters*, 2: 2841-2843.

Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M., Lqari, H., Megías, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M. & Millán, F. (2006) "Bioactive Peptides in Storage Plant Proteins." *Brazilian Journal of Food Technology*, 99-102.

Wagner, J. R. (2000) "Propiedades superficiales." Caracterización funcional y estructural de proteínas. Ed. Bartholomai G B y Pilosof A M R, Eudeba, Buenos Aires (Argentina).

Walstra, P. (1983) "Formation of emulsion." In Encyclopedia of Emulsion Technology: Basic Theory. Ed. Becher, P., Marcel Dekker Inc., New York (USA), 57- 127.

Walstra, P. (2003) "Surface phenomena." Physical Chemistry of Foods, Ed. P. Walstra.

Wang, J. S., Zhao, M. M., Zhao, Q. Z. & Jiang, Y. M. (2006) "Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems." Food Chemistry, 101(4): 1658-1663.

Wang, L. L. & Xiong, Y. L. (2005) "Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolysed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(23): 9186-9192.

Wang, W. Y. & De Mejia, E. G. (2005) "A new frontier in soy bioactive peptides can may prevent age-related chronic diseases." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 4: 63-78.

Waraho, T., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M. T., McClements, D. J. & Decker, E. A. (2009) "Prooxidant mechanisms of free fatty acids in stripped soybean oil-in-water emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 7112-7117.

Webb, K. E. (1990) "Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review." Journal of Animal Science, 68: 3011-3022.

Wei, Y. H. & Lee H. C. (2002) "Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation and impairment of antioxidant enzymes in aging." Experimental Biology and Medicine, 227:671-682.

Weil, J. & Bolton, J. (2007) "Electron Paramagnetic Resonance, Elementary Theory and Practical Applications." Wiley Interscience a John Wiley & Sons, 2^o Ed.

Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P. & Morris, V. (2004) "Proteins and emulsifiers."

Wilkinson, L. (1990) "Systat. The system for statistics." Evanston, IL: SYSTAT, Inc.

Williams, D. E., Dashwood, R. H., Hendricks, J. D. & Bailey, J. S. (1989) "Anticarcinogens and tumor promoters in foods." Food Toxicology, A Perspective on Relative Risks, 101-150.

Wilson, T. H. & Wiseman, G. (1954) "The use of sacs everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal Surface." The Journal of Physiology, 123(1): 116-125.

Woodcock, S., Williamson, I., Hassan, I. & MacKay, M. (1991) "Isolation and characterization of clones from the Caco-2 cell line displaying increased taurocholic acid transport." Journal of Cell Science, 98: 323-332.

Wright, J. S., Carpenter, D. J., McKay, D. J. & Ingold, K. U. (1997) "Theoretical calculation of substituent effects on the O-H bond strength of phenolic antioxidants related to vitamin E." Journal of the American Chemical Society, 119: 4245-4252.

Xie, Z., Huang, J., Xu, X. & Jin, Z. (2008) "Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate." Food Chemistry, 111: 370-376.

Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H. & Tokuda, H. (2000) "Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells." European Journal of Pharmaceutical Science, 47: 4022-4031.

Yim, M. H. & Lee, J. H. (2000) "Functional properties of fractionated soy protein isolates by proteases from Meju." Food Science and Biotechnology, 9: 253-257.

Yoshie-Stark, Y., Bez, J., Wada, Y. & Wäsche, A. (2004). "Functional properties, lipoxygenase activity and health aspects of Lupinus albus protein isolates" Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(25): 7681-7689.

Yu, T. W. & Ong, C. N. (1999) "Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2, 2-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid): rationale, application and limitation." Analytical Biochemistry, 275:217-23.

Zhang, P. & Omaye, S. T. (2001) "DNA strand breakage and oxygen tension: effects of β -carotene, α -tocopherol and ascorbic acid." Food and Chemical Toxicology, 39: 239-246.

Zhong, S., Ma, C., Lin, Y. & Luo, Y. (2011) "Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry." Food Chemistry, 126: 1636-1642.

Zhou, K., Caning, C. & Sun, S. (2013) "Effects of rice protein hydrolysates prepared by microbial proteases and ultrafiltration on free radicals and meat lipid oxidation." LWT-Food Science and Technology, 50: 331-335.

Zhu, K., Zhou, H. & Qian, H. (2006) "Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase." Process Biochemistry, 41(6):1296-1302.

Zhu, L. J., Chen, J., Tang, X., & Xiong, Y. L. (2008) "Reducing, radical scavenging and chelation properties of in vitro digests of Alcalase-treated zein hydrolysate." Journal of Agriculture and Food Chemistry, 56: 2714-2721.

Zhuang, Y. & Sun, L. (2011) "Preparation of reactive oxygen scavenging peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin: optimization using response surface methodology." Journal of Food Science, 76(3): C483-C489.

Zuang, V. (2001) "The neutral red release assay: a review." Alternatives to Laboratory Animals, 29: 575-599.

Zweibaum, A., Laburthe, M., Grasset, E. & Louvard, D. (1991) "Use of Cultured Cell Lines in Studies of Intestinal Cell Differentiation and Function." Handbook of Physiology: The Gastrointestinal System, 223-255.

